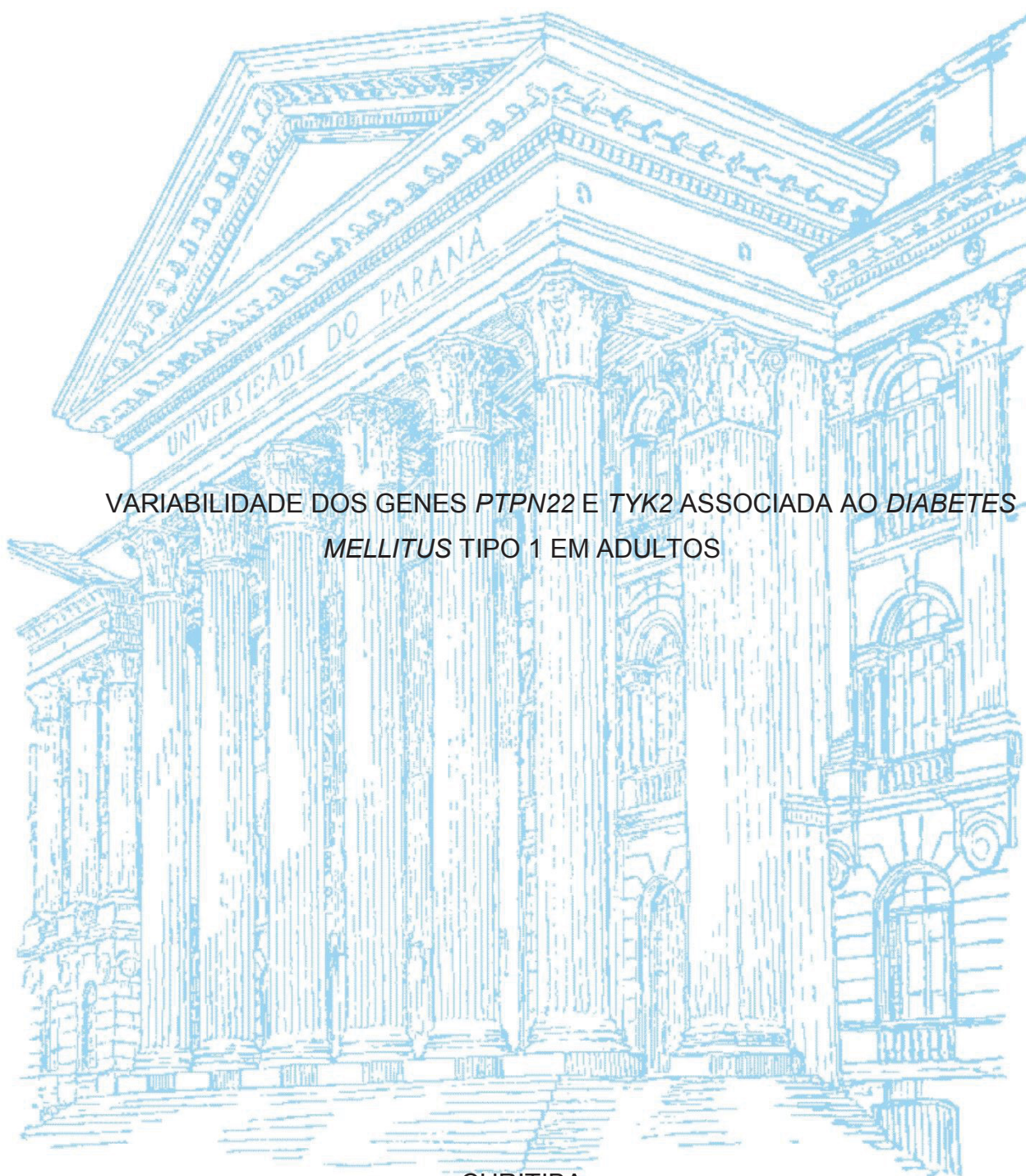


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA GRACIOLO



VARIABILIDADE DOS GENES *PTPN22* E *TYK2* ASSOCIADA AO *DIABETES MELLITUS* TIPO 1 EM ADULTOS

CURITIBA

2019

VANESSA GRACIOLO

VARIABILIDADE DOS GENES *PTPN22* E *TYK2* ASSOCIADA AO *DIABETES*
MELLITUS TIPO 1 EM ADULTOS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane G. M. Rego
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2019

Graciolo, Vanessa

Variabilidade dos genes PTPN22 e TYK2 associada ao *Diabetes mellitus* tipo 1 em adultos [recurso eletrônico] / Vanessa Graciolo – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Fabiane G. M. Rego

1. *Diabetes mellitus* tipo 1. 2. Polimorfismo (genética). 3. TYK2 Quinase.
I. Rego, Fabiane G. M. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.462



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VANESSA GRACIOLO** intitulada: **VARIABILIDADE DOS GENES PTPN22 E TYK2 ASSOCIADA AO DIABETES MELLITUS TIPO 1 EM ADULTOS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua A PROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2019.

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCIANE WELTER

Avaliador Externo (UFPR)

GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA BENETTI

Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me auxiliou a chegar até aqui, me dando proteção e sabedoria para alcançar este mérito.

Agradeço a Universidade federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Agradeço a minha orientadora professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego que me proporcionou a oportunidade de realizar o mestrado e por todo conhecimento e ensinamento.

Agradeço à professora Dra. Dayane Alberton, por ter me orientado no estágio de docência e pelos ensinamentos partilhados.

Ao meu co-orientador professor Dr. Geraldo Picheth agradeço pelos ensinamentos estatísticos e por sempre estar disposto a auxiliar quando precisei.

A Banca examinadora, Professora Dra. Graciele Cristiane More Manica e Dra. Marciane Welter pela disponibilidade e contribuição no meu estudo.

Aos meus colegas de laboratório, e em especial agradeço a Louryana Padilha de Campos e Melina Marques de Sousa, grandes amigas que tive o prazer de conviver nesta fase, muito obrigada pelas conversas, conselhos e apoio nestes dois anos.

Aos meus pais Maristela Graciolo e José Valeriano Graciolo e à minha irmã Jessica Graciolo que sempre acreditaram em mim e me apoiaram nas minhas conquistas.

Ao meu marido Leandro Weissheimer, que sempre me apoiou nesta fase de muita determinação e dedicação aos estudos e me deu forças para continuar.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“O sucesso nasce do querer, da
determinação e persistência em se chegar
a um objetivo. Quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

O *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune crônica caracterizada por hiperglicemia devido à produção insuficiente de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas. Considerado uma doença poligênica que é influenciada por fatores ambientais e por processos auto-imunes com presença de auto-anticorpos e linfócitos autorreativos, resultando em anormalidades metabólicas. O objetivo do estudo foi investigar a associação entre parâmetros bioquímicos e a variabilidade genética dos sítios polimórficos rs2476601 do gene *PTPN22* e rs2304256 do gene *TYK2* com DM1. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE 01038112.0.0000.0102). A amostra foi composta por 156 adultos (diagnosticados após 18 anos de idade) com DM1 e 150 controles saudáveis, pareados por idade e gênero. As genotipagens foram realizadas com sondas fluorescentes *TaqMan*®. Os polimorfismos estudados se encontraram dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. As frequências dos alelos de menor frequência (95%IC) em indivíduos com DM1 e grupo controle foram respectivamente, para o polimorfismo do gene *PTPN22* rs2476601 alelo T 6,7% (4-10%) vs. 6,3% (4-9%), $P=0,842$ e para o gene *TYK2* rs2304256 alelo A 19,6% (14-27) vs. 24,7% (20-35), $P=0,127$. Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos e frequências alélicas para os polimorfismos estudados ($P>0,05$). Os polimorfismos rs2476601 e rs2304256 não foram associados com DM1 na população estudada. As frequências para os alelos de menor frequência para ambos os polimorfismos foram semelhantes às de outras populações Caucasianas e diferentes quando comparados às populações Asiáticas e Africanas. No grupo DM1, portadores do alelo T do polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22* apresentaram diferença significativa ($P=0,020$) para a análise do AIP (índice aterogênico do plasma), representado por Log (TG/HDL-c), no grupo controle este efeito não foi observado.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus* tipo 1; Polimorfismo; *PTPN22*; *TYK2*.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is a chronic autoimmune disease characterized by hyperglycaemia due to inadequate production of insulin by the pancreatic islet β -cells. Considered a polygenic disease that is influenced by environmental factors and by autoimmune response with the presence of autoantibodies, resulting in metabolic abnormalities. The aim of this study was to investigate the association between biochemical parameters and the genetic variability of polymorphic sites rs2476601 of gene PTPN22 and rs2304256 of gene TYK2 with T1D. The study was approved by the Research Ethics Committee of the UFPR Health Sciences Sector (CAAE 01038112.0.0000.0102). The sample consisted of 156 adults ≥ 18 years (diagnosis after 18 years) with T1D and 150 healthy controls, matched by age and gender. The genotyping was performed with TaqMan® fluorescent probes. The studied polymorphisms were in the Hardy-Weinberg equilibrium. The frequencies of the minor allele frequency (95% CI) in individuals with T1D and control group respectively for the polymorphisms of the PTPN22 gene rs2476601 allele T 6.7% (4-10%) vs. 6.3% (4-9%), $P=0.842$ and of gene TYK2 rs2304256 allele A 19,6% (14-27) vs. 24.7% (20-35), $P=0.127$. There was no statistically significant difference in the comparison of genotypes and allelic frequencies for the polymorphisms in the tested ($P>0.05$). The polymorphisms rs2476601 and rs2304256 were not associated with T1D in the studied population. The minor allele frequency for both polymorphisms were similar to other Caucasians populations, and different when compared to Eastern and African populations. In the T1D group, the T allele of the polymorphism of the PTPN22 gene rs2476601 had a significant difference ($P = 0.020$) for the AIP (atherogenic index of plasma) analysis, represented by Log (TG / HDL-c) , in the control group this effect was not observed.

Key-words: Type 1 Diabetes Mellitus. Polimorphism. PTPN22. TYK2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HISTÓRIA NATURAL DO DM1.....	22
FIGURA 2 – PATOGÊNESE DO DM1	23
FIGURA 3 - EVENTOS DE SINALIZAÇÃO APÓS A OCUPAÇÃO DO RECEPTOR DE CÉLULAS T (TCR).....	33
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AÇÕES INIBITÓRIAS DE LYP NA SINALIZAÇÃO DE TCR	34
FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>PTPN22</i> .	35
FIGURA 6 – MODELO PROPOSTO PARA O PAPEL DO IFN α NAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS	38
FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>TYK2</i>	40
FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO TRABALHO	44
FIGURA 9 - GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs2476601 E MARCADORES DO PERFIL LIPÍDICO	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA DOSAGENS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	45
TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS	46
TABELA 3 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL	48
TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS	50
TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	55
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2476601 DO GENE <i>PTPN22</i>	60
TABELA 7 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2476601 DO GENE <i>PTPN22</i> COM DADOS DA LITERATURA	62
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2304256 DO GENE <i>TYK2</i>	65
TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2304256 DO GENE <i>TYK2</i> COM DADOS DA LITERATURA	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,5-AG	1,5 Anidroglucitol
AIP	Índice aterogênico do plasma
ALT	Alanina amino transferase
APC's	Células apresentadoras de antígenos
AST	Aspartato amino transferase
BCR	Receptor de Células
Csk	Quinase reguladora negativa
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM1A	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1A autoimune
DM1B	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1B idiopática
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> Gestacional
GAD65	Ácido Glutâmico Descarboxilase de 65 kDa
GGT	Gama glutamil transferase
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL-c	<i>Density Lipoprotein Cholesterol</i> – HDL-colesterol
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> – Antígeno Leucocitário Humano
H-W	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
IA2A	<i>Insulinoma-associated autoantigen 2</i> – autoanticorpos anti-tirosina fosfatase
IAA	<i>Insulin autoantibodies</i> - autoanticorpos contra a insulina
ICA	<i>Islet cell autoantibodies</i> - auto-anticorpos contra as ilhota
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN- α	Interferon alfa
IFNAR	Receptor Interferon1 alfa
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1

IL-8	Interleucina 8
INS-VNTR	Insulina – número variável de frequências repetidas
ITAMs	Tirosina imunorreceptores
JAK	Janus quinase
LAT	Conexão para ativação de células T
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein Cholesterol</i> – LDL-Colesterol
LYP	Proteína tirosina fosfatase linfóide
MHC	Complexo de principal histocompatibilidade
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the Young</i> – Diabetes da maturidade de início precoce
NF-kB	Fator nuclear-kB
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PTK	Proteína tirosina quinase
PTP	Proteína tirosina fosfatase
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i> – Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22
rs	<i>Reference Sequence</i> - Polimorfismos de único nucleotídeo
SEMPR	Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
SH3	Src Homology 3
SLP76	Fosfoproteína de 76 kDa específica de leucócito
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células
TNF- α	<i>Tumoral Necrose Factor α</i> – Fator de Necrose Tumoral α
TYK2	<i>Protein tyrosine kinase type 2</i> – Proteína tirosina quinase tipo 2
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VAV	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
ZAP-70	Proteína de 70kDa associada à cadeia zeta
ZNT8	<i>Zinc Transporter 8</i> – Transportador de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	<i>DIABETES MELLITUS</i>	18
2.2	<i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1A (DM1A).....	19
2.2.1	Critérios de diagnóstico	24
2.3	COMPLICAÇÕES RELACIONADAS AO DM	26
2.4	BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO	29
2.5	VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DM1	30
2.6	GENE <i>PTPN22</i> (<i>PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, NON-RECEPTOR TYPE 22</i>)	31
2.7	GENE <i>TYK2</i> (<i>TYROSINE KINASE 2</i>)	37
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	COMITÊ DE ÉTICA	42
3.2	AMOSTRA.....	42
3.2.1	Critérios para caracterização da amostra	42
3.3	FLUXOGRAMA DO PROJETO	43
3.4	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	44
3.5	ANÁLISES MOLECULARES	46
3.5.1	Variabilidades genéticas em estudo	46
3.5.2	Extração e quantificação do DNA	46
3.5.3	Reação de PCR em tempo real com sondas fluorescentes (Taqman).....	47
3.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	50
4.1.1	Sexo, Idade e etnia.....	51
4.1.2	Índice de massa corpórea (IMC).....	51
4.1.3	Histórico familiar de DM.....	51
4.1.4	Tabagismo.....	52
4.1.5	Hipertensão e dislipidemia.....	53

4.1.6	Nefropatia.....	54
4.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	54
4.2.1	Perfil glicêmico	55
4.2.2	Perfil lipídico e análise do índice aterogênico do plasma Log (TG/HDL-c)...	56
4.2.3	Perfil renal	58
4.2.4	Proteína total e albumina.....	58
4.2.5	Ácido úrico.....	59
4.2.6	Perfil hepático.....	59
4.3	ANÁLISES MOLECULARES	60
4.3.1	Polimorfismo rs2476601 do gene <i>PTPN22</i>	60
4.3.2	Polimorfismo rs2304256 do gene <i>TYK2</i>	65
5	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO 1	85
	ANEXO 2	87
	ANEXO 3	89
	ANEXO 4	90
	ANEXO 5	91

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma patologia cujo a incidência aumenta consideravelmente a cada ano. Em 2017, estimou-se que no Brasil havia 12,5 milhões de pessoas diabéticas, na faixa etária de 20 a 79 anos, ocupando o quarto lugar na lista dos países com prevalência da doença e estima-se que em 2045 este número chegue a 20,3 milhões (IDF, 2017). Este aumento ocorre em virtude do crescimento e do envelhecimento populacional e devido às mudanças no estilo de vida das populações, tais como da progressiva prevalência de obesidade e sedentarismo (SBD, 2016).

É uma doença complexa e crônica, pois apresenta riscos multifatoriais e um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que possui em comum a hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina e/ou na secreção da insulina (ADA, 2014).

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), foco do presente estudo, acomete 5% a 10% dos casos de diabetes (ADA, 2019). É uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células β pancreáticas que irá culminar com a interrupção da produção de insulina e consequentemente desequilíbrio metabólico grave (JAHROMI; EISENBARTH, 2007). A incidência do DM1 tem aumentado, particularmente na população infantil com menos de 5 anos de idade, porém pode manifestar-se de forma lenta e progressiva em adultos (SBD, 2016).

Apesar dos esforços para padronizar o diagnóstico do DM1, as causas e a fisiopatologia não são totalmente esclarecidas e o diagnóstico para diferenciar os dois tipos principais de DM é um desafio principalmente em adultos. A Federação Internacional de Diabetes (2017) estima que mundialmente 212 milhões de pessoas com DM não estão diagnosticadas e tem, portanto, um maior risco de desenvolver complicações. Isto destaca a relevância de um diagnóstico precoce e de uma identificação de prognóstico eficaz, assuntos que precisam ser mais elucidados pela literatura.

Apesar das terapias convencionais serem eficazes, uma melhor compreensão da patogênese auxilia na identificação de novos biomarcadores e no desenvolvimento de terapias moleculares para a patologia. Portanto, estudos que envolvem as variações genéticas associadas ao diabetes, com ênfase nos polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) podem

contribuir na identificação do mecanismo de suscetibilidade ou de proteção para o desenvolvimento do DM (NEWTON-CHEH; HIRSCHHORN, 2005).

Os polimorfismos são a forma mais comum de variação genética no genoma e podem auxiliar na identificação de biomarcadores informativos. A capacidade de reconhecer diferentes formas de herança de um gene ou diferentes segmentos do genoma fornece ferramentas essenciais para várias aplicações, tanto na pesquisa quanto na prática clínica (LIAO; LEE, 2010).

Neste contexto, a proposta desta dissertação foi avaliar a presença de variantes genéticas e suas relações com parâmetros bioquímicos em uma população sul-Brasileira, com o intuito de ampliar o conhecimento dos processos fisiopatológicos associados ao DM1 e identificar marcadores genéticos de risco ou proteção para esta patologia.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a associação entre a variabilidade genética de sítios polimórficos selecionados de adultos saudáveis e portadores de DM1 e correlacionar com biomarcadores séricos.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Quantificar os biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, função renal e função hepática em amostras de pessoas com DM1 e dos indivíduos saudáveis;
- Genotipar os polimorfismos rs2476601 do gene *PTPN22* e rs2304256 do gene *TYK2* em indivíduos diagnosticados com DM1 após os 18 anos de idade e indivíduos saudáveis (controle);

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas das variantes na busca de associação com o DM1 em uma amostra da população sul-Brasileira;
- Associar as variações genéticas identificadas nos grupos estudados com os dados clínicos e com os parâmetros bioquímicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) consiste em um distúrbio metabólico complexo caracterizado por hiperglicemia crônica, decorrente da deficiência relativa ou absoluta de insulina. A deficiência deste hormônio resulta em anormalidade nos metabolismos de lipídios, carboidratos e proteínas, ocasionando complicações vasculares em longo prazo (ADA, 2014; MENDANHA *et al.*, 2016).

A classificação baseia-se na etiologia da doença e de acordo com a Associação Americana de Diabetes (2019) a patologia é classificada em quatro classes clínicas:

- I. *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1)
- II. *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2)
- III. *Diabetes mellitus* gestacional (DMG)
- IV. Outras formas específicas de Diabetes

O DM1 é caracterizado pela destruição autoimune de células β pancreáticas produtoras de insulina por linfócitos citotóxicos $CD4^+$ com a contribuição dos linfócitos T $CD8^+$, levando ao comprometimento do metabolismo da glicose e consequentemente acarretando complicações micro e macrovasculares (GIZA *et al.*, 2013; STEFAN *et al.*, 2014). O DM1 é subdividido em *Diabetes mellitus* tipo 1A (DM1A), foco do presente estudo, o qual apresenta maior frequência nos casos de DM1, e envolve fatores genéticos e ambientais. Enquanto que a outra subdivisão *Diabetes mellitus* tipo 1B (DM1B) ou idiopático é caracterizado por não apresentar autoanticorpos contra as células β pancreáticas e por não estar associado à haplótipos do sistema HLA. Este tipo de DM1 possui maior frequência em pacientes com ascendência Africana ou Asiática (DIB, 2008; POCIOT; LERNMARK, 2016).

O DM2 é causado por uma combinação de resistência periférica à insulina e uma resposta secretora inadequada deste hormônio pelas células β pancreáticas. Esta classificação abrange 90 a 95% dos casos de diabetes e geralmente é diagnosticado após os 40 anos, porém pode ocorrer em qualquer idade (ADA, 2019). É considerado um distúrbio metabólico complexo de etiologia heterogênea com fatores de risco comportamentais, ambientais e genéticos (REINEHR, 2013).

Nas últimas décadas, foi possível a identificação de numerosas variações genéticas associadas ao DM2, contudo muitas das associações com as variantes permanecem sem explicação até o momento (GROOP, L.; POCIOT, 2014). Entre os fatores ambientais associados destacam-se hábitos de vida sedentários, dietas ricas em gorduras, envelhecimento e obesidade (SBD, 2016). Pacientes com DM2 frequentemente são diagnosticados após alguns anos do início da doença, porque a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e, em estágios iniciais, muitas vezes não é suficientemente grave para o aparecimento dos sintomas clássicos, como poliúria, polidipsia, polifagia e alterações visuais (COTRAN, 2012; ADA, 2018).

O DMG é o diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gestação, que claramente não seja DM1 ou DM2 pré-existente, e atinge cerca de 7% das gestações no Brasil, acarretando o aumento de morbidade e mortalidade perinatais (SBD, 2016; ADA, 2019). O DMG está associado à redução na função das células β pancreáticas e à diminuição da sensibilidade à insulina que é parcialmente explicada pela elevação na concentração de hormônios diabetogênicos, os quais bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina e são produzidos pela placenta, tais como a progesterona e o hormônio lactogênico placentário (DI CIANNI *et al.*, 2003).

A categoria “outras formas específicas de diabetes” inclui todas as outras formas menos comuns de DM e podem ocorrer devido a várias causas, entre as quais pode-se destacar: defeitos genéticos da função de células β pancreáticas (MODY), defeitos genéticos na ação da insulina, doenças exócrinas do pâncreas, endocrinopatias, indução química ou por drogas, infecções, formas incomuns de diabetes mediados pelo sistema imune e síndromes genéticas associadas ao diabetes em alguns casos (SBD, 2016; ADA, 2019).

2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1A (DM1A)

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência de DM1 está aumentando anualmente a uma taxa de 3 a 5% no mundo, porém correspondendo a 5 a 10% de todos os casos de DM (WANG, Z. *et al.*, 2017).

A crescente incidência de DM1 não está totalmente esclarecida mas foi atribuída a mudanças ambientais e no estilo de vida, implicando em um menor papel para a suscetibilidade genética (FOURLANOS *et al.*, 2008). Estudos

genéticos com pacientes que possuem DM1 indicaram que o aumento desta incidência foi acompanhado por uma frequência reduzida do genótipo HLA classe II de maior risco de suscetibilidade ao diabetes e maior penetração de genótipos de baixo risco de suscetibilidade (LONG *et al.*, 2012).

A taxa de incidência (por 100.000 habitantes por ano) do DM1 em indivíduos com menos de 20 anos de idade é considerada alta nos países escandinavos, destacando-se com maior incidência a Finlândia (57,2%), seguida por países Europeus, da América do Norte e a Austrália (IDF, 2017; KATSAROU *et al.*, 2017). Conforme a Federação Internacional de Diabetes (2017) estima-se que o Brasil possua mais de 88 mil portadores de DM1 menores de 20 anos e ocupa o terceiro lugar no mundo em prevalência de DM1 em crianças e adolescentes. Em países asiáticos, como a China, o DM1 é considerado uma doença de baixa prevalência, sendo que atinge 0,4 casos para cada 100.000 pessoas (PEI *et al.*, 2014). Esta variação pode estar relacionada à prevalência de fatores de risco genéticos, ambientais e de estilo de vida (KATSAROU *et al.*, 2017). Existe informação escassa na literatura sobre a incidência do DM1 em adultos, não havendo dados suficientes para determinar se a incidência vem aumentando como em crianças, mas foi demonstrado predominância da incidência em homens em relação as mulheres adultas, o que não ocorre em crianças, embora não se tenha uma explicação para tal fato (DIAZ-VALENCIA; BOUGNERES; VALLERON, 2015)

O DM1 resulta da destruição auto-imune das células β pancreáticas presente nas ilhotas de Langerhans, acarretando uma deficiência completa na produção de insulina. Embora a idade de início sintomático seja geralmente durante a infância ou adolescência, os sintomas podem desenvolver-se mais tarde (ACHARJEE *et al.*, 2013). Algumas evidências mostram que o DM1 com início na fase adulta podem ter características próprias como função mais preservada das células β pancreáticas, frequência reduzida de auto-anticorpos e menor prevalência de alelos de suscetibilidade HLA classe II quando comparado ao DM1 diagnosticado em crianças e adolescentes (RODACKI *et al.*, 2005; HOWSON *et al.*, 2012).

Embora as causas do DM1 não sejam completamente conhecidas, envolve os fatores genéticos e ambientais (COSTENBADER *et al.*, 2012).

Até o momento, a base genética do DM1 apresenta mais de 50 genes, porém estes não são suficientes para elucidar a doença, pois estudos realizados

entre gêmeos monozigóticos revelaram concordância para a doença em cerca de 50% dos casos, sugerindo a contribuição das variáveis não genéticas (POCIOT; LERNMARK, 2016). Logo, o desencadeamento do DM1 provavelmente depende de fatores ambientais juntamente com os genes predisponentes para induzir um ataque auto-imune contra as células β pancreáticas (OP DE BEECK; EIZIRIK, 2016).

Embora vários fatores ambientais sejam considerados responsáveis pela progressão do DM1, até então, a maioria de seus mecanismos continua desconhecida (SABERZADEH-ARDESTANI *et al.*, 2018). Destacam-se como fatores propostos por afetar a epidemiologia do DM1 as infecções virais, particularmente por enterovirus (VAN DER WERF *et al.*, 2007), imunizações, dieta, exposição ao leite de vaca em idade precoce, deficiência na suplementação de vitamina D, infecções durante a gestação, drogas e toxinas (KANTAROVA; BUC, 2007; OP DE BEECK; EIZIRIK, 2016; SBD, 2016). Na primeira infância as infecções virais estão relacionadas à auto-imunidade nas ilhotas pancreáticas e à progressão para DM1 em crianças com suscetibilidade genética (MUSTONEN; SILJANDER, 2018).

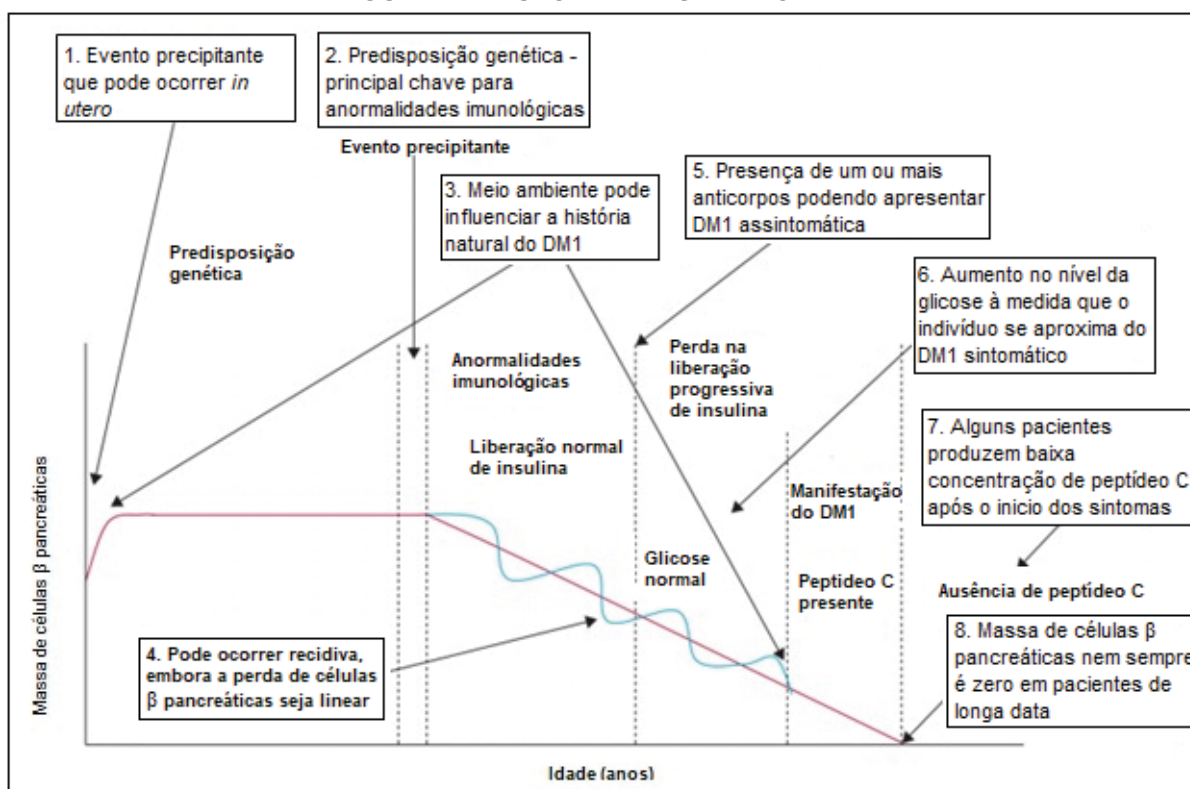
Estudos recentes sugerem que modificações epigenéticas também podem estar envolvidas na patogênese da doença, destacando-se as anormalidades dos padrões de metilação do DNA, conhecidos por regular a transcrição de genes (STEFAN *et al.*, 2014).

A história natural do DM (FIGURA 1), demonstra que no início, as pessoas nascem com um grau de suscetibilidade alto ou baixo para o desenvolvimento de DM1. Aproximadamente um quinto dos caucasianos tem suscetibilidade genética ao DM1 (BUTALIA *et al.*, 2016). O próximo passo requer exposição a alguns fatores ambientais que podem ocorrer no útero e provavelmente continuam durante os primeiros meses e no decorrer dos anos e afetam o início e a continuação da auto-imunidade nas células β pancreáticas (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

O processo auto-imune geralmente se inicia anos antes da doença se tornar evidente, com a perda progressiva da reserva de insulina com o decorrer do tempo. As alterações metabólicas são marcadas pela diminuição da resposta inicial ao peptídeo C pelo menos 2 anos antes do início da doença e um aumento linear na glicemia plasmática nos meses anteriores ao início. Quando uma massa crítica

de células β é destruída, ocorre o aparecimento dos sintomas, após uma fase silenciosa que persiste por meses ou por anos. A capacidade de reter a função de células β residuais (avaliada pela produção de peptídeo C) é heterogênea, em relação ao tempo que leva para alcançar um estágio indetectável e o número de pacientes que, apesar de décadas com DM1, mantêm a capacidade de produzir peptídeo C (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

FIGURA 1 – HISTÓRIA NATURAL DO DM1



Estágios no desenvolvimento do DM1. Os estágios estão listados da esquerda para a direita e a massa hipotética de células β pancreáticas está plotada contra a idade.

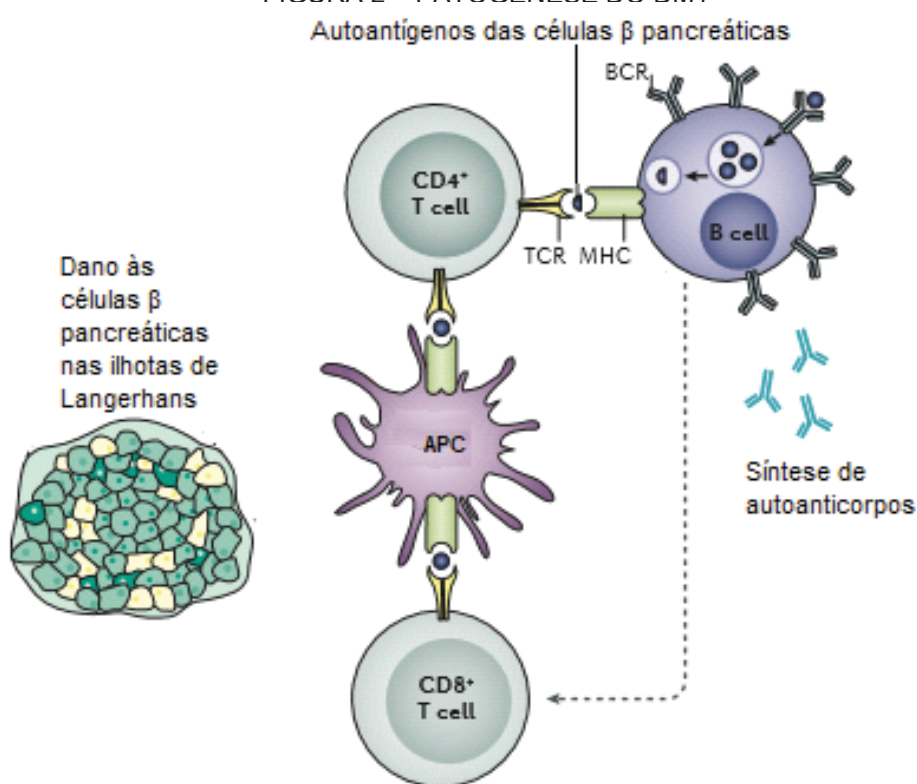
FONTE: Adaptado de Atkinson e colaboradores (2014).

A história natural do DM1 indica que a disfunção auto-imune se desenvolve em estágios, destacando-se a heterogeneidade da doença e assim sugerindo-se um papel para a genética, a idade no início da doença e a capacidade de reter a função das células β pancreáticas (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Embora a etiologia do DM1 não seja completamente elucidada, a patogênese da doença (FIGURA 2) envolve a destruição das células β pancreáticas que é mediada por uma resposta imunológica e por anomalias genéticas resultando em aumento de citocinas pró-inflamatórias e a expansão de linfócitos autorreativos T e B (SHARP *et al.*, 2015). O processo de destruição das

células β pancreáticas ocorre quando as células apresentadoras de antígenos (APCs), como as células dendríticas e os macrófagos apresentam autoantígenos das células β pancreáticas através do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC) às células T $CD4^+$ (SILVA, M. E. R.; MORY; DAVINI, 2008). Esta destruição é decorrente de um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância das células T aos antígenos próprios, resultando em insulite, um infiltrado inflamatório nas ilhotas de Langerhans do pâncreas constituído por linfócitos T (células $CD4^+$, $CD8^+$ e Treg), linfócitos B, macrófagos e células dendríticas (HEROLD *et al.*, 2013).

FIGURA 2 – PATOGÊNESE DO DM1



Os antígenos das células β pancreáticas são capturados e apresentados por células apresentadoras de antígeno (APCs) às células T $CD4^+$. A ativação de células T $CD8^+$ autorreativas pode levar ao reconhecimento e destruição das células β . As células T $CD4^+$ ativam as células B para produzir autoanticorpos contra a insulina. BCR, receptor de células B; TCR, receptor de células T.

FONTE: Adaptado de Katsarou e colaboradores (2017).

A falha na autotolerância pode ser resultante de deleções clonais defeituosas nas células T autorreativas no timo, defeitos nas funções das células T reguladoras ou resistência das células T efectoras à supressão pelas células T reguladoras (COTRAN, 2012).

O processo de recrutamento de células T para as ilhotas pancreáticas envolve a produção local de quimiocinas por APCs, especialmente interleucina1

(IL-1), interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF α). As quimiocinas são um grupo de péptidos de baixo peso molecular que recrutam, ativam e co-estimulam células do sistema imunológico (ROTONDI *et al.*, 2007). A exposição prolongada destas citocinas acarreta a apoptose das células β pancreáticas ocasionando a diminuição da massa de células β pancreáticas em produzir e liberar insulina (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013).

As células T CD4⁺ também são células auxiliares ativadoras de células T CD8⁺ autorreativas que podem levar ao reconhecimento e também a destruição das células β pancreáticas. Além disso, a exposição das células B aos auto-antígenos de células β leva à produção de auto-anticorpos direcionados às ilhotas (KATSAROU *et al.*, 2017).

Os auto-anticorpos são produzidos e os linfócitos autorreativos se ativam e infiltram o pâncreas para destruir as células β pancreáticas produtoras de insulina. Esta destruição persistente e direta pode ocorrer por muitos anos sem ser verificada, e os primeiros sintomas clínicos só se tornam evidentes após a maioria das células β pancreáticas terem sido destruídas ou tornadas disfuncionais (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

2.2.1 Critérios de diagnóstico

Muitos estudos revelam uma variação pronunciada na tendência da incidência de DM1 com a idade. O DM1 na infância tem uma incidência aumentada com a idade e atinge seu pico entre 10 à 14 anos de idade (XIA *et al.*, 2019) com apenas limitada inconsistência de estudos (WOJCIK *et al.*, 2015; FERNANDEZ-RAMOS *et al.*, 2017; SHALTOUT *et al.*, 2017) relatando uma incidência entre 5 à 9 anos de idade. Por outro lado, a incidência de DM1 diminui após os 14 anos de idade, e tal tendência de declínio persiste na idade adulta (DIAZ-VALENCIA; BOUGNERES; VALLERON, 2015). Contudo, o paradigma tradicional de que o DM1 ocorre apenas na infância e o DM2 apenas na fase adulta não é mais acurado, ambas as doenças ocorrem em ambos os grupos de idade (ADA, 2019). O diagnóstico de DM1 versus DM2 pode ser um desafio principalmente em adultos. Cerca de 5 a 15% dos adultos diagnosticados com DM2 podem ter DM1 com auto-anticorpos de ilhotas presentes, o que significa que o número de casos de DM1

provavelmente pode ser subestimado (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

O diabetes pode ser diagnosticado utilizando como critério a glicemia plasmática, tanto pelo valor da glicemia em jejum ou pelo valor da glicemia 2 horas durante o teste de tolerância oral à glicose, como pelo critério da HbA1c (INTERNATIONAL EXPERT, 2009; ADA, 2019):

- Glicemia em jejum (definida como ausência de ingesta calórica durante período mínimo de 8 horas) ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/l);
- Glicemia 2 horas após ingestão de 75g de glicose anidra dissolvida em água ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/l);
- Hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$. A determinação da HbA1c deve realizada pelo método padronizado pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) e certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP);
- Glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/l) em paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, perda de peso) ou em crise hiperglicêmica.

Contudo, uma vez que a progressão da disglycemia pode ser rápida em pacientes com DM1, a HbA1c é menos sensível para o diagnóstico do que as dosagens de glicemia em jejum ou glicemia estimulada (ADA, 2019).

Como o DM1 é uma doença auto-imune, pode ser detectado pela presença de auto-anticorpos contra as ilhotas pancreáticas. Mais de 90% dos indivíduos com DM1 recém diagnosticados possuem um ou mais auto-anticorpos, como os auto-anticorpos contra as ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA), autoanticorpos contra a insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), autoanticorpos contra ácido glutâmico descarboxilase (*glutamic acid decarboxylase* - GAD65) e autoanticorpos anti-tirosina fosfatase IA2 (*insulinoma-associated autoantigen 2* - IA2A) (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; KATSAROU *et al.*, 2017).

A taxa de progressão do DM1 é dependente da idade na primeira detecção do anticorpo, especificidade e título de anticorpos (ADA, 2018). Quando o DM1 se inicia na infância, estes auto-anticorpos podem aparecer aos seis meses de idade, com uma incidência de pico antes dos dois anos de idade em indivíduos geneticamente suscetíveis, indicando que os auto-anticorpos estão presentes

meses a anos antes do início dos sintomas (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

As dosagens de GAD65 e IA2A são recomendadas para confirmação inicial da suspeita diagnóstica do DM1 e a positividade de IA2A sugere-se ser um marcador mais específico de destruição de células β pancreáticas (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011; WINTER; SCHATZ, 2011). Para o diagnóstico do DM1, se GAD65 e IA2A forem negativos, as dosagens de ICA em adultos e IAA em crianças devem ser realizadas (WINTER; SCHATZ, 2011). O auto-anticorpo IAA frequentemente surge em crianças com idade inferior a 10 anos (KAHALY; HANSEN, 2016). A presença de GAD65 está associada com idade mais avançada e pode representar uma propensão para a auto-imunidade (HOWSON; STEVENS; *et al.*, 2011).

2.3 COMPLICAÇÕES RELACIONADAS AO DM

Em condições normais a insulina é um hormônio anabólico que desempenha um papel no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Possui como função metabólica estimular a captação da glicose pelos músculos e tecido adiposo, estimular a glicólise e promover a síntese de triglicérides e proteína do músculo esquelético (HARDIE, 2012).

Nas pessoas com diabetes a deficiência de insulina e as concentrações elevadas de hormônios contra-regulatórios estimulam a lipólise e inibem a lipogênese, resultando em altas concentrações circulantes de ácidos graxos livres. Esses ácidos graxos livres são absorvidos pelo fígado e oxidados em corpos cetônicos (ácido beta-hidroxibutirato e acetoacetato). Os corpos cetônicos são ácidos relativamente fortes que se dissociam em pH fisiológico, produzindo uma grande carga de íons de hidrogênio. A acidose metabólica ocorre à medida que as reservas alcalinas do corpo se esgotam na tentativa de tamponar os íons de hidrogênio e os ânions cetônicos. Além disso, a taxa na qual estes compostos são formados excede a taxa na qual são captados e oxidados pelos tecidos extra-hepáticos (ELEDRISI *et al.*, 2006). A concentração de glicose acima da normalidade resultando na concentração elevada de corpos cetônicos ocasiona a cetoacidose diabética (CAD), complicação aguda mais comum em pacientes que apresentam DM1 (KITABCHI *et al.*, 2009).

O início do DM é caracterizado pelos sintomas clássicos, tais como poliúria, polidipsia e polifagia, os quais são resultantes das alterações metabólicas que ocorrem nesta patologia (SBD, 2017). A hiperglicemia conduz ao aumento da osmolaridade do fluido extracelular, levando ao deslocamento hídrico intracelular para o compartimento extracelular. Além disso, a elevada concentração plasmática de glicose excede o limiar renal para a reabsorção e ocorre a glicosúria, que induz diurese osmótica, causando uma intensa perda de água e eletrólitos. A polidipsia resulta da depleção de água intracelular devido à hiperosmolaridade pelo aumento crescente da glicemia com estímulo dos receptores osmóticos do centro de sede no cérebro. Com a deficiência de insulina, ocorre a mudança de anabolismo promovido pela insulina para catabolismo acentuado de proteínas e lipídeos, que tende a induzir um balanço de energia negativo, causando polifagia (BOGLIOLO; BRASILEIRO, 2006; GUYTON; HALL, 2006; COTRAN, 2012).

As complicações crônicas decorrentes do diabetes são a maior causa de redução na qualidade de vida, morbidade e mortalidade. As complicações macrovasculares (doença isquêmica do coração, doença cerebrovascular e doença vascular periférica) afetam cerca de 50% das pessoas com diabetes (WHO, 2016). O risco relativo de morte devido a complicações crônicas macrovasculares é três vezes maior nos pacientes com DM do que na população que possui doenças cardiovasculares (TSCHIEDEL, 2014). Existem diversos mecanismos que participam do aumento do risco de doença macrovascular no diabético. A hiperglicemia é apenas um deles, como também estão envolvidos a hipertensão arterial, a dislipidemia e o fumo (SBD, 2016).

A aterosclerose é uma doença progressiva de origem multifatorial que muitas vezes, precede a hiperglicemia e, conseqüentemente, o diagnóstico clínico de diabetes. O estresse oxidativo e a glico-oxidação são promovidos pela hiperglicemia e danificam as células endoteliais que revestem a parede arterial e conseqüentemente promovem inflamação na camada íntima da artéria coronariana. Isso acarreta o depósito de lipídios e lipoproteínas oxidadas na parede arterial, o que induz uma resposta imune induzida por macrófagos e linfócitos T, resultando em inflamação local e apoptose (HASS; MCDONNELL, 2018).

A hiperglicemia também acarreta as complicações microvasculares, afetando a retina, os nervos periféricos e os glomérulos renais, sendo que 12-55%

dos pacientes com diabetes possuem insuficiência renal, 35% desenvolvem retinopatia, e 2,6% ficam cegas (WHO, 2016).

A retinopatia em pacientes que possuem DM1 caracteriza-se pela diminuição do fluxo sanguíneo nos vasos retinianos, o que estimula a proliferação compensatória de vasos retinianos frágeis e com grande permeabilidade, características que levam a hemorragias e o vazamento de proteínas na retina podendo ocasionar cegueira (KATSAROU *et al.*, 2017).

A neuropatia que acomete cerca de 50% dos indivíduos com diabetes com mais de 20 anos de doença, manifesta-se mais frequentemente como neuropatia periférica, que consiste no funcionamento anormal dos nervos periféricos, ocasionando redução na sensibilidade superficial, principalmente nos pés. Quando pacientes não controlados são acometidos por neuropatia, um processo infeccioso pequeno pode evoluir para necrose tecidual e posterior amputação (DOGIPARTHI *et al.*, 2017). Essas pessoas são mais suscetíveis a infecções cutâneas devido à função diminuída dos neutrófilos e à produção prejudicada de citocinas pelos macrófagos (COTRAN, 2012).

Outra complicação microvascular do DM é a nefropatia diabética que é considerada uma das principais causas de doença renal crônica (DRC), sendo mais comum em indivíduos com diabetes do que naqueles que não possuem a doença. É caracterizada pela presença de albuminúria em quantidades superiores a 300 mg/dia, que geralmente é acompanhada por um declínio progressivo na função renal, devido ao dano que é causado nos pequenos vasos sanguíneos dos rins (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013).

Vários estudos demonstram que diferentes vias metabólicas da glicose através da formação de metabólitos tóxicos estão envolvidas no desenvolvimento das complicações vasculares e que apresentam como consequência danos as proteínas, carboidratos, lipídios e ao DNA (JEONG; KING, 2011; SBD, 2016).

No DM1, o papel do controle glicêmico na contribuição das complicações crônicas está claro e é bem estabelecido através de observações e estudos clínicos prospectivos (THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP, 1996; DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL/EPIDEMOLOGY-OF-DIABETES-INTERVENTIONS-AND-COMPLICATIONS-RESEARCH-GROUP, 2000; DIABETES *et al.*, 2009). As

complicações estão relacionadas com exposição do indivíduo à hiperglicemia (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010).

2.4 BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO

Existem biomarcadores que preveem a vulnerabilidade do paciente às complicações diabéticas consequentemente auxiliando nas estratégias terapêuticas. O acesso a eficiência do controle glicêmico no paciente diabético pode ser feito através do auto-monitoramento da glicose no sangue (SMBG) e hemoglobina glicada (HbA1c). O monitoramento contínuo da glicemia (CGM) também tem um papel importante na avaliação da eficácia e segurança do tratamento em subgrupos de pacientes com DM e em pacientes selecionados com DM2 (ADA, 2018). Outros exames podem ser utilizados no acompanhamento do DM, alguns deles de forma análoga à HbA1c, ou seja, como estimativas da glicemia média por determinado período de tempo. Exames como glicemia pós-prandial, frutossamina, 1,5-anidroglicitol (1,5-AG) e albumina glicada podem acrescentar informação à estimativa da glicemia média e/ou mensurar a variabilidade glicêmica (SBD, 2017).

Há evidências relevantes na associação entre concentrações elevadas de HbA1c e as complicações microvasculares (KUHTREIBER *et al.*, 2015). A formação da HbA1c ocorre via uma reação de glicação não-enzimática entre o grupo aldeído livre da glicose e um grupo amino livre na molécula da hemoglobina, obtendo-se um composto intermediário que é proporcional à concentração de glicose no ambiente (CAMARGO; GROSS, 2004). Como as hemácias são livremente permeáveis à glicose, a medida de HbA1c apresenta como vantagens: reflete a média das glicemias do paciente nos últimos 120 dias, sofre menor variabilidade dia a dia e independe do estado de jejum para sua determinação (SBD, 2016).

O 1,5-anidroglicitol (1,5-AG) tem sido preconizado para o monitoramento do diabetes como um biomarcador de controle glicêmico suplementar à HbA1c (DUNGAN, 2008). É um monossacarídeo encontrado na maioria dos alimentos (OUCHI *et al.*, 2017) e considerado um marcador de glicosúria induzida por glicemia, uma vez que é um poliol metabolicamente inerte que compete pelos mesmos receptores que os da glicose para reabsorção renal (SATO, A., 2014). Na

hiperglicemia, conforme aumenta a filtração glomerular de glicose, diminui a reabsorção tubular do 1,5-AG, ocasionando a elevação de sua excreção renal e queda de sua concentração plasmática (SBD, 2016). As concentrações séricas de 1,5-AG refletem um controle glicêmico dos 3-7 dias que antecedem a coleta, pois variam rapidamente de acordo com as concentrações plasmáticas de glicose (WANG, Z. *et al.*, 2017).

2.5 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DM1

Um grande desafio após a determinação do genoma humano é identificar as funções fisiológicas dos genes e elucidar a base molecular para as doenças humanas. A forma mais comum de variação genética no genoma é o SNP, o qual é encontrado em mais de 1% da população (SUH; VIJG, 2005). A varredura de um genoma por SNPs pode ajudar a identificar milhões de biomarcadores informativos e têm sido amplamente utilizados como marcadores genéticos de doenças humanas genéticas, podendo proporcionar evidências para o envolvimento de um determinado gene na fisiopatologia humana (LIAO; LEE, 2010).

Estima-se que o genoma humano possua onze milhões de polimorfismos, sendo que alguns são mais propensos a ser funcionais, podendo aumentar ou diminuir o risco para determinadas doenças. Exemplo disto é o polimorfismo *missense*, o que resulta da substituição de um nucleotídeo levando a troca de um aminoácido, podendo ser evolutivamente deletério ou benéfico para uma determinada doença (NEWTON-CHEH; HIRSCHHORN, 2005).

A compreensão sobre os genes de predisposição é mais conhecida para DM1 do que para o DM2, dada a forte contribuição da variação na região HLA para o risco de DM1. Com relação ao DM2, o conhecimento sobre os fatores ambientais (obesidade, sedentarismo) é muito maior do que a compreensão das causas genéticas subjacentes (GROOP, L.; POCIOT, 2014).

A região do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) é o principal determinante genético de suscetibilidade para o DM1, está localizado no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e representa pelo menos cerca de 50% do risco genético para desenvolvimento do DM1 na população Caucasóide (CLAYTON, 2009). Os indivíduos com os genótipos HLADR e HLADQ de risco apresentam maior probabilidade de desenvolverem auto-anticorpos e

consequentemente DM1 (POCIOT; LERNMARK, 2016). Entre as três classes de HLA (I, II e III), os polimorfismos HLA de classe II são os que apresentam maior associação com risco para DM1 e podem influenciar os processos de tolerância imune no timo ou na geração insuficiente de células T reguladoras (KATSAROU *et al.*, 2017).

Além da região HLA, inúmeros outros *loci* gênicos tem mostrado associação com DM1, incluindo *INS-VNTR* (*Insulin - Variable Number Tandem Repeat*) o qual confere 10% da susceptibilidade genética, *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*), *TYK2* (*tyrosine kinase 2*), entre muitos outros genes que estão sendo investigados para avaliar o seu papel na auto-imunidade da doença (SILVA, M. E. R.; MORY; DAVINI, 2008).

Grande parte dos genes associados ao DM1 está relacionada a mecanismos que pode predispor o indivíduo a uma resposta imune alterada, aumentando potencialmente o risco de auto-imunidade, incluindo o desenvolvimento e a manutenção da tolerância (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Enquanto que outros genes, como o *locus* da insulina e alguns *locus* de tirosina fosfatases, podem afetar a função das células β pancreáticas e a sinalização após a apresentação do antígeno (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008).

2.6 GENE *PTPN22* (*PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE, NON-RECEPTOR TYPE 22*)

Muitos genes identificados como causadores ou predisponentes de auto-imunidade codificam proteínas que estão envolvidas em transdução de sinais em linfócitos, macrófagos ou células dendríticas. Entre elas, as proteínas tirosina fosfatase (PTPs), as quais sinalizam moléculas que modulam e regulam processos celulares tais como, crescimento, diferenciação, ciclo mitótico, transformação oncogênica e sobrevivência das células (SHARP *et al.*, 2015).

Estas proteínas são altamente expressas na maioria das células do sistema imune e são consideradas reguladoras na transdução de sinais, pois são enzimas que neutralizam a ação das proteínas tirosinas quinases (PTKs) através da remoção de fosfato dos resíduos de tirosina (BOTTINI *et al.*, 2004; SACCHETTI; BOTTINI, 2017). Portanto, um equilíbrio dinâmico entre fosforilação de tirosina e desfosforilação de moléculas de sinalização é crucial para manter a homeostase do

sistema imunológico, o qual envolve processos como a diferenciação, ativação ou inibição de linfócitos (VANG *et al.*, 2012; GIANCHECCHI; PALOMBI; FIERABRACCI, 2013).

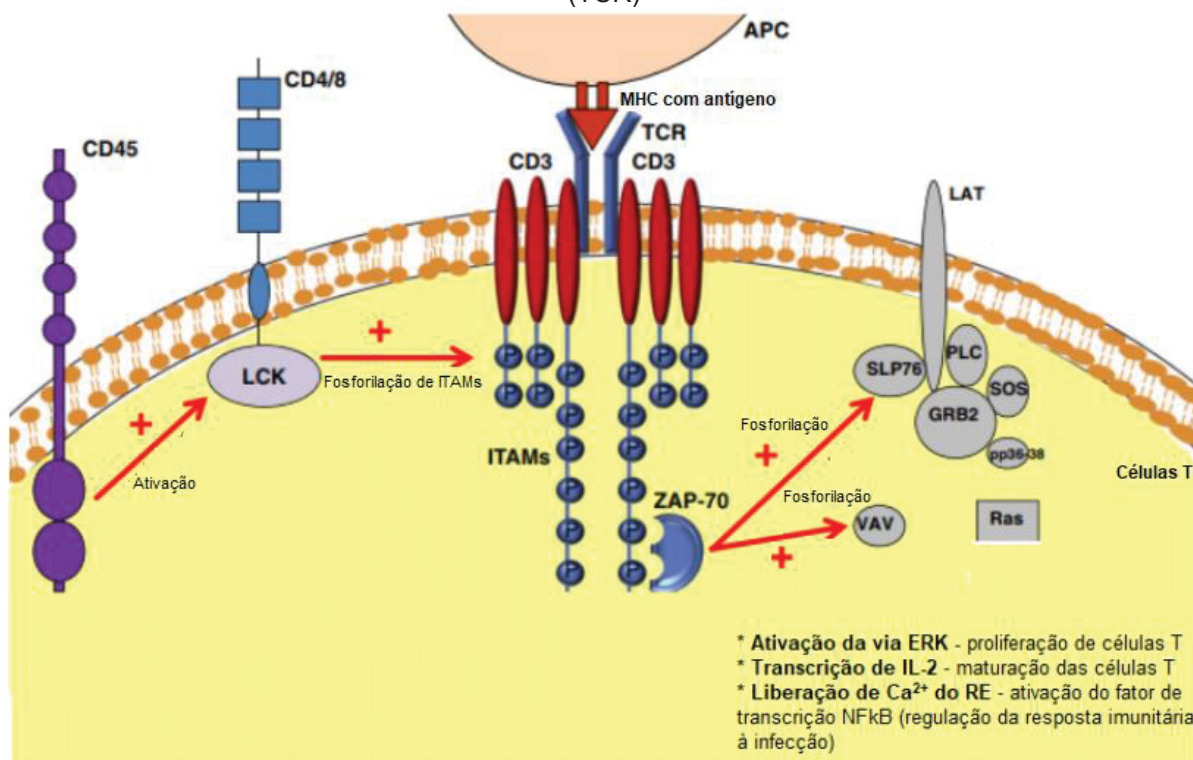
A proteína tirosina fosfatase não receptora 22 (PTPN22) possui 807 aminoácidos e também é referida como proteína tirosina fosfatase linfóide específica (*lymphoid-specific tyrosine phosphatase* - LYP) (VANG *et al.*, 2007; PRADHAN; BORSE; GHOSH, 2010). Esta proteína pode ser encontrada em três isoformas (LYP 1, LYP 2 e LYP 3), sendo LYP 1 a isoforma mais abundante (BLASETTI *et al.*, 2017). Apresenta peso molecular de 110 kDa e é expressa nas células *natural killer* e nos neutrófilos em níveis mais altos, seguidos pelas células T CD8⁺, enquanto que as células T CD4⁺ e os monócitos expressam os níveis mais baixos de LYP (BEGOVIĆ *et al.*, 2004).

A proteína LYP consiste de um domínio catalítico N-terminal, um interdomínio com estrutura ainda desconhecida, e uma porção C-terminal que contém quatro motivos ricos em prolina (P1-P4) os quais são fundamentais para interação com diferentes proteínas (BURN *et al.*, 2011). Em condições normais LYP se associa através do seu motivo mais rico em prolina (chamado P1) com o domínio SH3 (Src Homology 3) da tirosina quinase C-terminal (CSK), regulador negativo na sinalização mediada através do receptor de antígenos das células (VANG *et al.*, 2012). O complexo LYP/CSK ancorado a membrana do lado citoplasmático, inativa Lck, o qual regula positivamente a sinalização através dos receptores de células T (*T-cell receptor* - TCR) após a ligação do peptídeo ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (BOTTINI *et al.*, 2004).

É importante compreender como ocorre a transdução de sinal para ativação dos linfócitos T para assim entender a função da LYP. O reconhecimento do antígeno específico apresentado pelo MHC das células apresentadoras de antígeno para o TCR induz a ativação das células T através de uma cascata de eventos de transdução de sinal que envolve uma subsequente fosforilação de quinases reguladoras positivas (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). A quinase Lck causa fosforilação de ITAM's (motivos de ativação baseados em tirosina imunorreceptores) em resposta à estimulação TCR e desencadeiam múltiplas vias de sinalização intracelular (STANFORD; BOTTINI, 2014). Logo após o reconhecimento do antígeno pelo receptor TCR, o complexo LYP-CSK se

dissocia para ocorrer a ativação dos linfócitos T (GIANCHECCHI; PALOMBI; FIERABRACCI, 2013) (FIGURA 3).

FIGURA 3 - EVENTOS DE SINALIZAÇÃO APÓS A OCUPAÇÃO DO RECEPTOR DE CÉLULAS T (TCR)



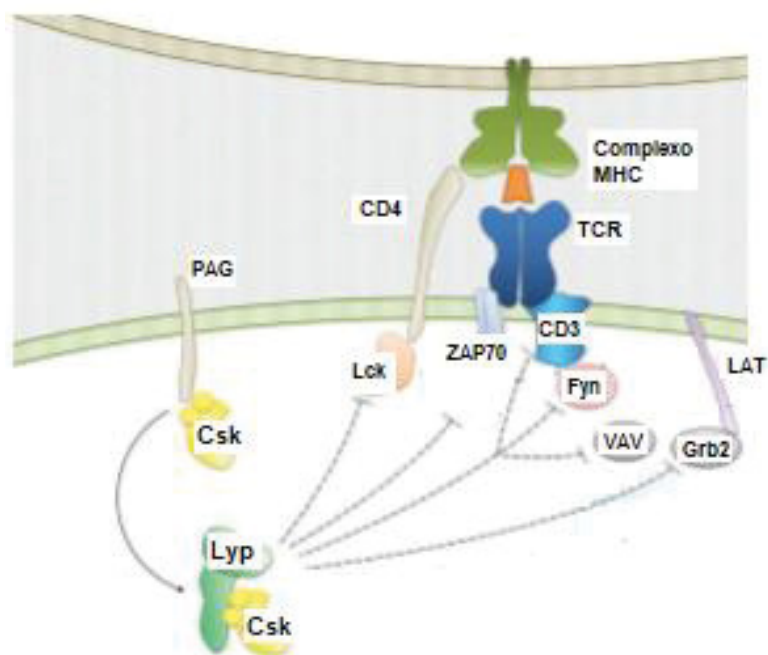
O reconhecimento do antígeno específico apresentado através do MHC para o TCR induz a ativação dos linfócitos T. CD45 inicia a ativação da Lck (proteína tirosina quinase) através da desfosforilação de resíduos de tirosina, consequentemente ocorre a fosforilação de ITAMs que gera sítios de ligação de alta afinidade para ZAP-70 (proteína de 70kDa associada à cadeia zeta). Posteriormente, ZAP-70 fosforila os intermediários LAT (conexão para ativação de células T), SLP76 (fosfoproteína de 76 kDa específica de leucócito), Vav (*guanine nucleotide exchange factor*) e GRB2 (proteína 2 de ligação ao receptor de fator do crescimento). Entre os efeitos finais, ocorre a ativação da via ERK (quinase reguladora por sinal extracelular), a qual acarreta a ativação de fatores de transcrição e desencadeia a proliferação de células T, a indução da transcrição de IL-2 e a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático que desencadeia a ativação do fator de transcrição NF κ B. Após a estimulação de TCR, o complexo formado por LYP-CSK se dissocia.

FONTE: Adaptado de Gianchecchi e colaboradores (2013).

Assim, LYP tem uma função inibitória na expansão clonal e diferenciação das células T, atuando como um modulador negativo da sinalização TCR (GJORLOFF-WINGREN *et al.*, 1999; HILL *et al.*, 2002). De acordo com a FIGURA 4, a proteína LYP inibe a ativação das células T através da desfosforilação e inativação destas quinases associadas ao receptor de células T e seus substratos, e assim desempenha um papel importante na auto-imunidade, prevenindo a proliferação autorreativa de linfócitos T (BOTTINI *et al.*, 2004; BURN *et al.*, 2011; WANG, X.-F. *et al.*, 2013; PREZIOSO *et al.*, 2017). Estudos mostraram que LYP

pode regular negativamente a via de sinalização proximal após a ativação do receptor de células T, afetando assim a maturação e a proliferação destas células (HILL *et al.*, 2002). A função da LYP nos linfócitos B pode ser equivalente (RIECK *et al.*, 2007; BURN *et al.*, 2011).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE AÇÕES INIBITÓRIAS DE LYP NA SINALIZAÇÃO DE TCR

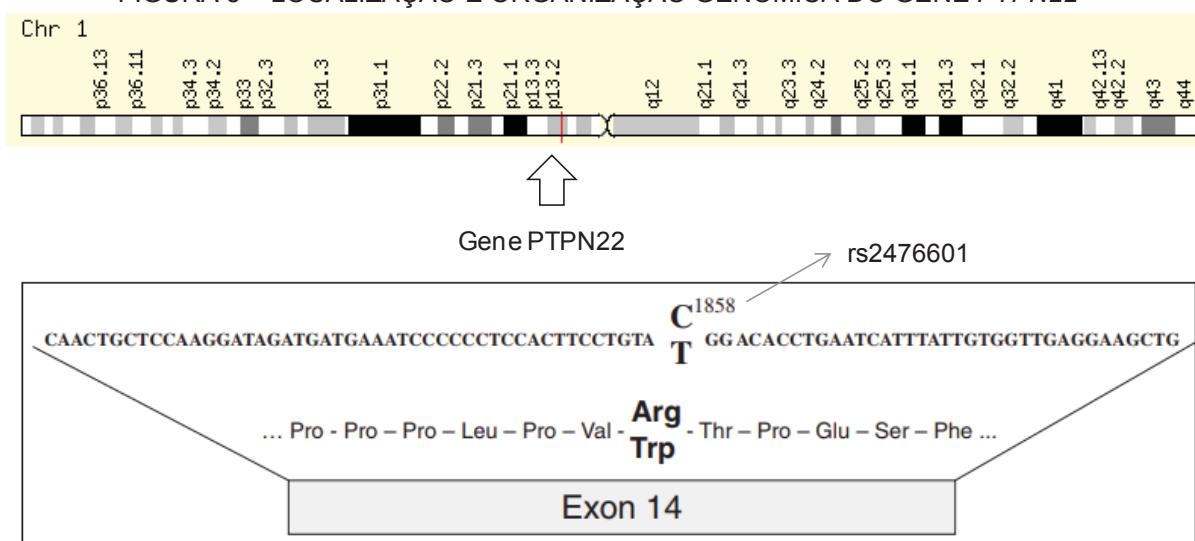


LYP apresenta uma função inibidora para expansão e diferenciação clonal de células T, atuando como um modulador negativo da sinalização TCR. LYP interage com uma série de substratos implicados na cascata proximal do receptor de células T (TCR), incluindo a proteína tirosina quinase Lck, ZAP70, Vav, *cluster of differentiation* 3 (CD3), Grb2 e FYN *proto-oncogene* (Fyn). Em condições normais, LYP interage com Csk e forma um complexo ancorado ao lado citoplasmático da membrana celular, inativa o Lck, que regula positivamente a sinalização de TCR após o reconhecimento do antígeno específico processado e apresentado através do MHC para o TCR.

FONTE: Adaptado de Prezioso e colaboradores (2017).

Assim, é possível especular que alteração ou aumento da função de LYP pode afetar as células T regulatórias (T reg) e seu papel na supressão das reações auto-imunes (VANG *et al.*, 2008).

Este gene está localizado no cromossomo 1p13.2 (COHEN *et al.*, 1999). O gene de 58 kb compreende 21 exons (ONENGUT-GUMUSCU; BUCKNER; CONCANNON, 2006) (FIGURA 5).

FIGURA 5 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *PTPN22*

Localização do gene *PTPN22* no cromossomo 1 no locus p13.2. Sequência nucleotídica do gene *PTPN22* contendo o polimorfismo C1858T localizado no exon 14 e a sequência de aminoácidos mostrando a troca de arginina por triptofano (R620W) no rs2476601.

FONTE: Adaptado de Dultz e colaboradores (2009).

Um dos polimorfismos mais estudados no gene *PTPN22* é a variante C1858T (rs2476601), onde ocorre a troca de citosina por timina na posição 1858 no exon 14 (FIGURA 5), resultando uma mutação missense com a substituição do aminoácido arginina (CGG) por triptofano (TGG) no códon 620 (R620W) (BOTTINI *et al.*, 2004).

Este polimorfismo confere fator de risco ao DM1 entre a população Causasiana (PREZIOSO *et al.*, 2017) e suscetibilidade a outras doenças autoimunes, incluindo doença de graves (VELAGA *et al.*, 2004), lúpus eritematoso sistêmico (KYOGOKU *et al.*, 2004), miastenia Graves (VANDIEDONCK *et al.*, 2006), artrite reumatóide (BEGOVIĆ *et al.*, 2004) e tireoidite de Hashimoto (BLASETTI *et al.*, 2017). A associação é altamente reproduzível e encontrada em muitas populações diferentes e está restrita a doenças que geralmente possuem auto-anticorpos (ABBASI *et al.*, 2017).

As consequências dessa variante genética na regulação do sistema imune estão sendo investigadas. Um estudo analisou a diminuição na ativação e proliferação de células T CD4⁺ de pessoas com diabetes portadores da variante *PTPN22* 1858T (AARNISALO *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram que a fosforilação de tirosina de proteínas, como Lck, Erk1, LAT envolvidas nos primeiros eventos de sinalização TCR foi reduzida em células que expressam triptofano em LYP (LYP-Trp620) em comparação com células que expressam arginina (LYP-

Arg620). Da mesma forma, a produção de IL-2 responsável pela indução da maturação de células B e T, foi reduzida após a estimulação de TCR e a mobilização de cálcio foi mais inibida com a presença do polimorfismo (VANG *et al.*, 2005).

Embora o mecanismo de ação do polimorfismo a nível bioquímico e molecular no gene *PTPN22* ainda seja questionável, são discutidos os modelos "ganho de função da enzima" e "perda de função da enzima" que podem desempenhar um papel no desenvolvimento do DM1 (BURN *et al.*, 2011).

Estudos funcionais *in vitro* com células T primárias indicaram que o polimorfismo C1858T poderia ser uma mutação de "ganho de função", por codificar uma fosfatase com atividade mais catalítica e atuar como um inibidor mais potente na sinalização de TCR em comparação com a enzima do tipo selvagem (VANG *et al.*, 2012). Isto pode acarretar maior supressão na cascata de sinalização TCR durante o desenvolvimento no timo, resultando em uma falha na supressão de células T autorreativas que seriam eliminadas durante a seleção negativa do timo, ocorrendo assim a fuga destas células para a periferia ou ocasionando atividade insuficiente das células T reguladoras (VANG *et al.*, 2007; CHAGASTELLES *et al.*, 2010). Mais estudos são necessários para compreender o papel da atividade aumentada da fosfatase de LYP-Trp620 na patogênese das doenças autoimunes (GIANCHECCHI; PALOMBI; FIERABRACCI, 2013).

No modelo "perda de função" a substituição do aminoácido arginina pelo triptofano na proteína LYP diminui a capacidade da fosfatase para se ligar ao domínio SH3 de Csk, implicando na interrupção do mecanismo de desativação das células T. Isso resultaria em desequilíbrio na tolerância das células T, levando a uma expansão de células T autorreativas, consequentemente favorecendo a ativação imune e assim podendo ocasionar uma grande perda na função das células β pancreáticas em indivíduos portadores do alelo T no rs2476601 (MENARD *et al.*, 2011; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011; BLASETTI *et al.*, 2017). Normalmente *PTPN22* desempenha um papel na regulação da homeostase dos linfócitos efetores e reguladores, o que garante que o número total de linfócitos na periferia permaneça relativamente constante, porém com a formação da proteína na forma alterada esta homeostase é prejudicada (BROWNLIE *et al.*, 2012).

A falta ou baixo nível de tolerância aos auto-antígenos faria com que as células T tornem-se reativas, contribuindo para o ataque imunológico aos próprios tecidos (SAKAGUCHI *et al.*, 2001). As células T e particularmente as células T auxiliares de tipo 1 são as principais responsáveis pela destruição das células β pancreáticas (WILSON *et al.*, 1998). Além disso, estudos indicam que a tolerância reduzida em pacientes com DM1 ocorre em parte pela diminuição da capacidade das células T reguladoras $CD25^+$ e $CD4^+$ para vencer a proliferação de células T reativas (LINDLEY *et al.*, 2005).

A proteína LYP é expressa nos linfócitos B, porém seu papel na sinalização mediada por receptor de célula B (*B-cell receptor* - BCR) não está totalmente esclarecido (ARECHIGA *et al.*, 2009). Nos linfócitos B, a variante alélica acarretou a redução na sinalização do receptor BCR o que resultou em uma falha na indução dos mecanismos de tolerância às células B e a liberação de células B autorreativas na periferia (MENARD *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que pacientes com DM1 que apresentavam alelo de risco *PTPN22* foram caracterizados por altas frequências de clones autorreativos e pela remoção prejudicada de células B autorreativas, o que também demonstra a associação de *PTPN22* e a auto-imunidade (MENARD *et al.*, 2011; GIANCHECCHI; PALOMBI; FIERABRACCI, 2013).

Além disso, estudos indicaram que a variação alélica pode induzir um aumento na expressão de vários genes pertencentes às vias de sinalização do receptor BCR como CD40, TRAF1 e IRF5, que codificam proteínas que promovem a ativação de células B e consequentemente acarreta o aumento na sobrevivência de células B autorreativas (MENARD *et al.*, 2011; GALVANI; FOUSTERI, 2017).

2.7 GENE *TYK2* (*TYROSINE KINASE 2*)

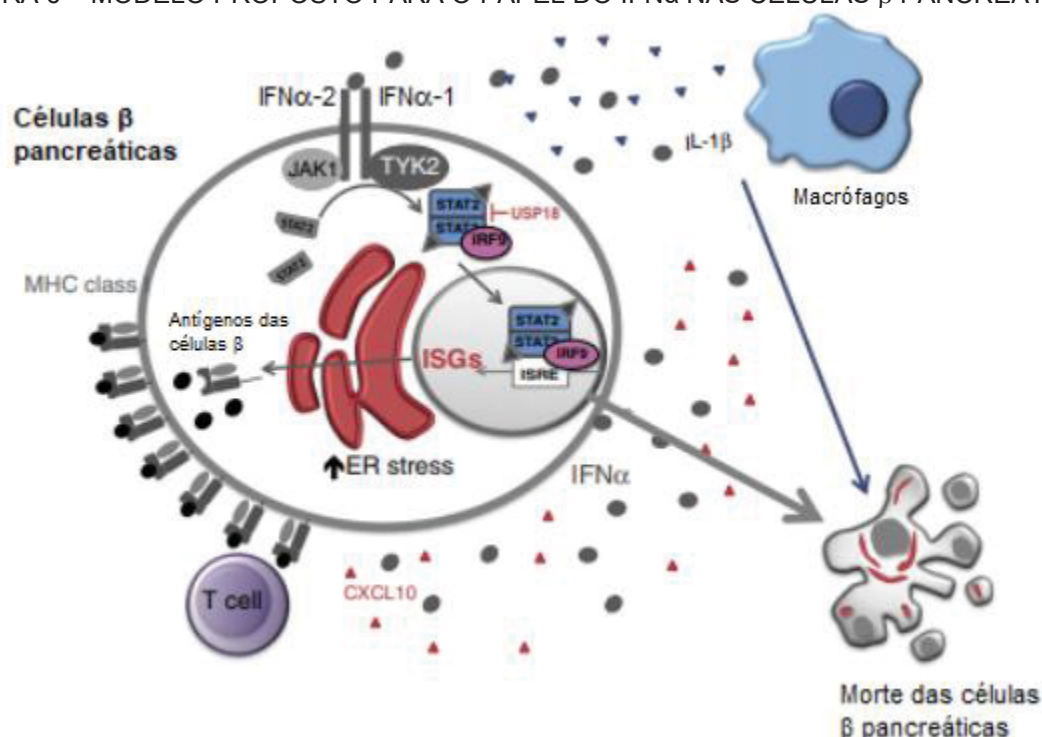
As proteínas tirosina quinases são as enzimas que catalisam a adição de fosfato aos resíduos de tirosina (SACCHETTI; BOTTINI, 2017). Estas proteínas fazem parte da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo de regulação pode causar alterações químicas e estruturais de proteínas até o controle transcricional (SILVA, B. *et al.*, 2009).

A proteína tirosina quinase 2 (*tirosine kinase 2* - *TYK2*) é especificamente expressa em células epiteliais, incluindo células de ilhotas pancreáticas (TONIOLO;

LESLIE, 2017). TYK2 é uma proteína citoplasmática relativamente grande com um peso molecular de aproximadamente 130 kDa e com cerca de 1200 aminoácidos (STROBL *et al.*, 2011; LEITNER *et al.*, 2017). Esta proteína é um membro da família da Janus quinase (JAK), que possui na sua estrutura um domínio catalítico de tirosina quinase C-terminal, um domínio de quinase central e uma grande região N-terminal subdividida em cinco regiões homólogas à (JH7 a JH3), estas regiões são necessárias para a ligação do TYK2 ao receptor IFN α (IFNAR) (KYOGOKU *et al.*, 2009).

Após exposição à infecção e outros mediadores exógenos, a produção e liberação de IFN tipo 1 (IFN1) é desencadeada nas células β pancreáticas (MARROQUI *et al.*, 2017). O IFN α se liga e fosforila o receptor IFNAR, e inicia assim uma cascata de sinalização, a qual ativa TYK2 e ocasiona o aumento da expressão dos genes IFN1 com a ativação do sinal de transdução e ativadores de transcrição (STATs) (KYOGOKU *et al.*, 2009; TAO *et al.*, 2011) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – MODELO PROPOSTO PARA O PAPEL DO IFN α NAS CÉLULAS β PANCREÁTICAS



Após a ligação de IFN α com IFNAR, TYK2 interage fisicamente com o heterocomplexo IFNAR1/IFNAR2 juntamente com JAK1, ativando STAT1 e STAT2. Os heterodímeros STAT se translocam para o núcleo, onde se ligam a uma sequência de DNA chamada elemento de resposta estimulada por IFN (ISRE) para induzir a expressão de genes *IFN1* (*Interferons Via the JAK-STAT Signaling* - ISGs), estimulando a transcrição adicional de genes. Essa ativação induz uma hiperexpressão de proteínas do MHC de classe I e um aumento da quimiocina CXCL10. O IFN α também sensibiliza a liberação de IL-1 β por macrófagos aumentando assim a morte das células β .
 FONTE: Adaptado de Marroqui e colaboradores (2017).

Assim, a via de sinalização do IFN α resulta em efeitos importantes na imunidade inata e na inflamação (VOGL *et al.*, 2010).

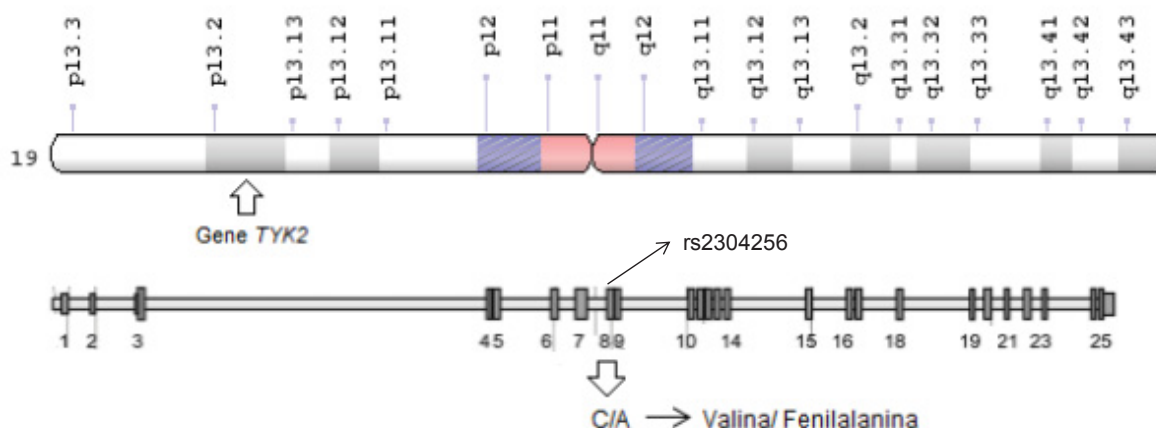
A família IFN1 inclui mais de 20 membros, destacando-se principalmente IFN α e IFN β (STROBL *et al.*, 2011). Várias evidências têm emergido sobre as ações destas citocinas na inibição do crescimento celular, indução a apoptose e muitas atividades imunorreguladoras, sendo que originalmente foi descoberto por sua atividade anti-viral (HONDA *et al.*, 2005).

Estudos sugeriram que TYK2 auxilia na regulação das vias apoptóticas e pró-inflamatórias nas células β pancreáticas via sinalização intracelular de IFN α e interleucinas (IL-10, IL-6, IL-12, IL-23, IL-27), na regulação positiva do MHC de classe I, aumentando a eficiência na apresentação de antígenos de células β às células imunes e na modulação de quimiocinas CXCL10 que são importantes para o recrutamento de células T para as ilhotas pancreáticas (JANG *et al.*, 2015; MARROQUI *et al.*, 2015). A conjunção desses fatores pode desencadear auto-imunidade em indivíduos geneticamente predispostos (MARROQUI *et al.*, 2017).

Além disso, estudos evidenciaram que o IFN α prejudica a produção de insulina através da indução do estresse no retículo endoplasmático e auxilia no aumento da expressão de HLA-I em pacientes com DM1 e a ativação de linfócitos T CD8 citotóxicos autorreativos contra as células β pancreáticas (LOMBARDI *et al.*, 2018).

O gene *TYK2*, conforme a FIGURA 7, está localizado no cromossomo 19p13.2 e contém 25 exons. O polimorfismo rs2304256, também identificado como V362F, está localizado no exon 8 e causa uma mutação missense em *TYK2*, com a troca de C (citosina) por A (adenina), conduzindo a uma substituição de valina por fenilalanina na posição 362 na região JH4 (KYOGOKU *et al.*, 2009; WALLACE *et al.*, 2010).

Esta variante diminui a interação entre TYK2 e IFNAR1 e dificulta a preservação da expressão do IFNAR1 nas membranas celulares (MARROQUI *et al.*, 2015). Portanto, sugere-se que este polimorfismo reduz a função de TYK2, ocasionando uma diminuição na suscetibilidade a doenças auto-imunes e inflamatórias relacionadas com IFN, porém os mecanismos para detalhar esta diminuição necessitam de mais estudos (TAO *et al.*, 2011).

FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *TYK2*

O gene *TYK2* está localizado no cromossomo 19 e possui 25 exons. O polimorfismo rs2304256 está localizado no exon 8.

FONTE: Adaptado de Sigurdsson e colaboradores (2005).

O alelo A menos frequente do polimorfismo rs2304256 demonstrou relação com algumas doenças auto-imunes como DM1 (WALLACE *et al.*, 2010), lúpus eritematoso sistêmico (SIGURDSSON *et al.*, 2005) e esclerose sistêmica (LOPEZ-ISAC *et al.*, 2016).

O polimorfismo rs2304256 foi associado a um risco diminuído para desenvolver DM1 (MARROQUI *et al.*, 2015). A natureza protetora deste polimorfismo sugeriu que os indivíduos que possuem o alelo A podem ter uma capacidade reduzida de resposta aos IFNs nas células β pancreáticas. Este evento pode acarretar uma expressão reduzida dos genes induzidos pelo IFN e consequentemente diminuir a inflamação nas ilhotas pancreáticas (SANTIN; EIZIRIK, 2013).

Uma mutação natural que reduz a expressão do gene *TYK2* torna os ratos mais suscetíveis a infecções virais devido à redução na capacidade de resposta celular ao IFN1 e outras citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e IL-23) (SANTIN; EIZIRIK, 2013). Um estudo realizado por Izumi e colaboradores (2015) demonstrou que a redução na expressão do gene *TYK2* nas células β pancreáticas de ratos devido à mutação natural é responsável pela suscetibilidade ao DM induzido por vírus pancreotrópico. Isto sugeriu que a baixa expressão de *TYK2* se correlacionou com uma resposta anti-viral menos eficiente nos animais testados (STORLING; POCIOT, 2017).

Conforme o estudo de Marroqui e colaboradores (2015) uma inibição de 50% na atividade de *TYK2* por siRNAs (*small interfering RNA*) específicos em

células β pancreáticas expostas a dsRNA (dupla fita RNA) viral sintético apresentaram menor ativação da via de IFN1 e menor produção de IFN α e quimiocina CXCL10. Estas células também apresentaram expressão diminuída das proteínas MHCI, que tornou as células β pancreáticas menos suscetíveis à apoptose quando induzidas por dsRNA viral sintético do que as tratadas com um siRNA de controle (inativo).

Minegishi e colaboradores (2006) identificaram um paciente com deficiência de *TYK2* que apresentava defeitos imunológicos mais graves do que estudos que foram realizados com camundongos deficientes de *TYK2*. Os defeitos de sinalização resultaram na suscetibilidade a múltiplos patógenos infecciosos, diferenciação prejudicada das células Th1 (*T helper 1*), pois *TYK2* também atua na sinalização de IL-12, e manifestações clínicas complexas como a Síndrome de Hiper IgE (HIES).

Estudos futuros serão necessários para delinear a relação estrutura-função e esclarecer o envolvimento de *TYK2* em redes de regulação imunológica (STROBL *et al.*, 2011). Alguns trabalhos estão analisando a possibilidade de utilizar o *TYK2* como um alvo para intervenção terapêutica nas doenças inflamatórias e auto-imunes (MALERICH *et al.*, 2010), pois um inibidor seletivo de *TYK2* poderá proporcionar uma proteção contra a auto-imunidade e possibilitar uma melhor compreensão do papel fisiológico desta quinase (NORMAN, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O projeto obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná sob o Registro CAAE: 01038112.0.0000.0102, com número de parecer 7186, para a utilização das amostras de pacientes com DM1 (ANEXO 1).

3.2 AMOSTRA

As amostras deste estudo foram utilizadas do biorrepositório do laboratório de Bioquímica Clínica I e II da Universidade Federal do Paraná, provenientes do HC-UFPR. A criação do biorrepositório foi baseada na Portaria nº 2201, de 14 de setembro de 2011. Amostras adicionais dos pacientes com DM1 foram obtidas através da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR (SEMPR), sendo que participaram do estudo somente aqueles que não manifestaram objeção à proposta científica através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

Amostras dos adultos sem diabetes (controle) foram obtidas do banco de sangue do Hospital das Clínicas da UFPR.

Foram utilizadas amostras de soro e sangue total de indivíduos que foram diagnosticados com DM1 após os 18 anos de idade ($n = 156$) e adultos sem a doença (grupo controle, $n = 150$), as quais foram pareadas por gênero e idade.

Os dados antropométricos (idade, peso, altura) dos grupos controle e DM1 foram obtidos através de entrevista direta (ANEXO 3).

3.2.1 Critérios para caracterização da amostra

Este estudo é caracterizado como tipo caso-controle em uma população do Sul do Brasil.

Os critérios para a caracterização dos grupos em estudo foram:

a) Grupo *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1): pacientes (homens e mulheres) portadores da doença que foram diagnosticados após 18 anos de idade e que se

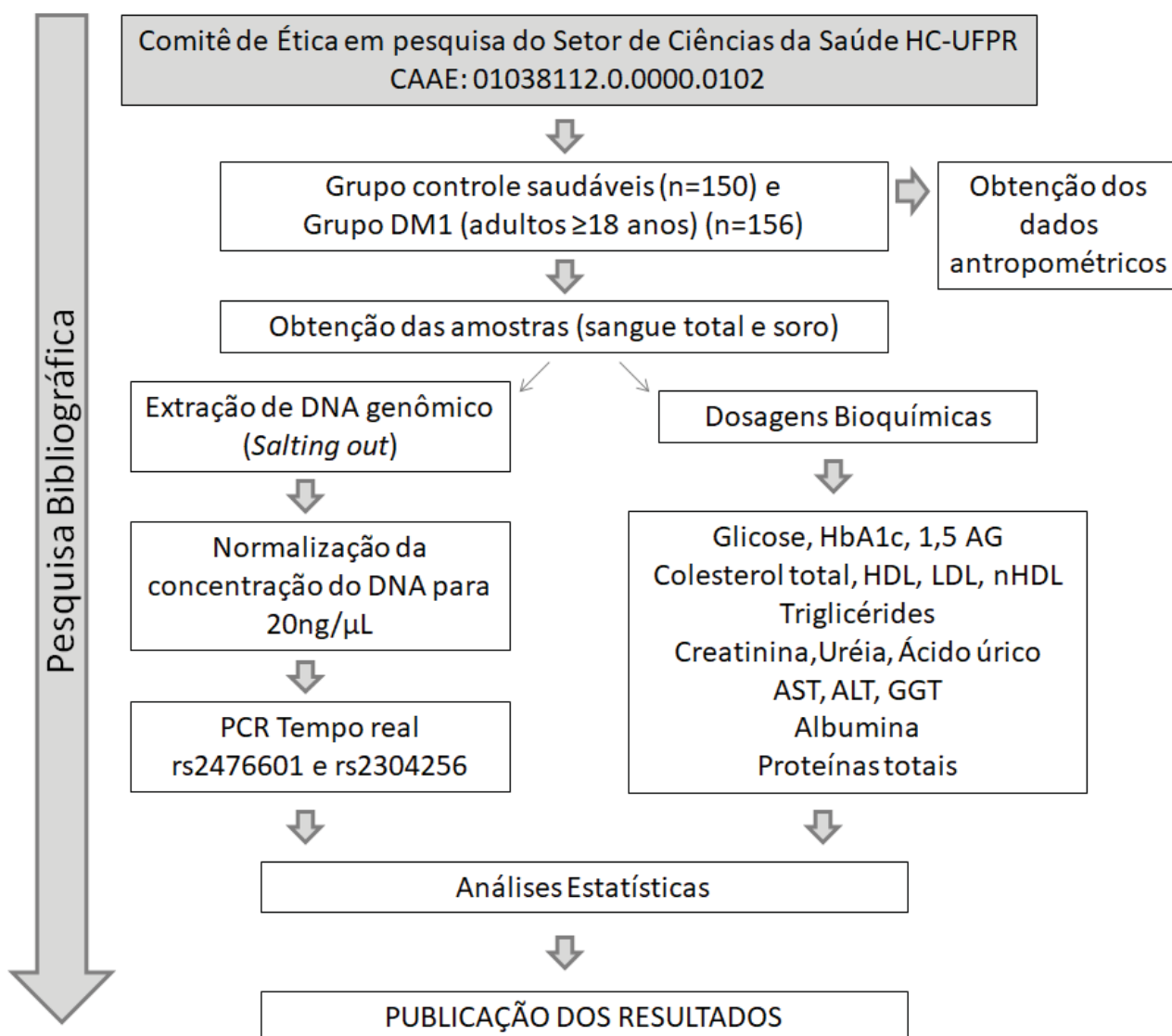
enquadraram nos critérios de diagnóstico da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2019) e na Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2016).

b) Grupo Controle (indivíduos saudáveis): ambos os gêneros com idade superior ou igual a 35 anos e inferior ou igual a 57 anos para parear com os pacientes DM1. Incluído somente indivíduos que não apresentavam quaisquer patologias, reportadas pelo paciente ou identificadas após o processo de doação de sangue.

3.3 FLUXOGRAMA DO PROJETO

O fluxograma ilustrado na FIGURA 8 demonstra as principais etapas do trabalho.

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO TRABALHO



FONTE: O autor (2018).

3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue total em tubos secos com gel separador sem anticoagulante para obtenção do soro e 4 mL em tubos Vacuette contendo o anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutiner) utilizado para os ensaios de HbA1c e extração de DNA. As amostras coletadas em tubo Vacuette com gel separador foram centrifugadas por 15 minutos a 5.000 rpm em centrífuga compacta Z 206A Hermlelogo. Após a centrifugação, o soro foi separado em alíquotas de aproximadamente 0,5 ml que foram armazenadas em freezer a -20°C e -80°C até a realização das dosagens. Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictericas foram excluídas de todos os ensaios.

A TABELA 1 apresenta as metodologias, o coeficiente de variação e os intervalos de referência utilizados para a dosagem dos analitos estudados.

TABELA 1 – METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA DOSAGENS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Analito	Princípio do método	CVa %	Valores de referência
1,5 anidroglicitol	Enzimático colorimétrico Glycomark	3,4	>10 µg/mL
Ácido úrico	Colorimétrico uricase/ peroxidase-Trinder	1,6	2,5 – 7,0 mg/dL
Albumina	Reação com verde de bromocresol	1,9	3,3 – 4,7 g/dL
AST	Ensaio cinético UV com L-aspartato, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	2,2	10 – 39 U/L
ALT	Ensaio cinético UV com L-alanina, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	1,6	10 – 45 U/L
Colesterol Total*	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	2,0	Desejável: <190 mg/dL
Creatinina	Picrato alcalino cinético	3,2	0,5 – 1,4 mg/dL
GGT	Ensaio cinético com L-γ-glutamil-3-carbox- 4-nitronilida e p-nitroanilina	1,1	Homem: 7-58 U/L Mulher: 5-39 U/L
Glicose	Hexoquinase UV	1,9	60 – 99 mg/dL
HbA1c	Imunoturbidimétrico	0,8	4,0 – 6,0%
HDL-c*	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	3,5	Desejável > 40
não HDL-c*	Cálculo: CT- HDL-c	-	<160mg/dL Baixo risco <130mg/dL Risco Intermediário <100mg/dL Alto risco <80mg/dL Muito alto risco
LDL-c*	Cálculo pela equação de Friedewald**	-	<130mg/dL Baixo risco <100mg/dL Risco Intermediário <70mg/dL Alto risco <50mg/dL Muito alto risco
Log (TG/HDL-c)***	Cálculo: Log(TG/HDL-c)	-	<0,11 Baixo risco 0,11-0,21 Risco médio >0,21 Alto risco
Proteínas totais	Reação de Biureto	2,4	6,0 – 8,0 g/dL
Triglicérides	Ensaio enzimático com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase com Reação de Trinder	1,9	Desejável com jejum: <150 mg/dL Desejável sem jejum: <175 mg/dL
Ureia	Ensaio cinético UV com urease, GLDH e NADH	1,9	15 – 45 mg/dL

LEGENDA: Determinações realizadas com reagentes, padrões e calibradores da Abbott, em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil). Bem como para os ensaios da labtest. CVa, coeficiente de variação analítica interensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração normal. *Atualização Diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose, 2017. **Equação de Friedewald, LDL-c = Colesterol total – HDL-c – Triglicérides/5. ***Calculador do índice aterogênico.

FONTE: O autor (2018).

As dosagens bioquímicas incluíram marcadores de controle glicêmico (glicemia, hemoglobina glicada – HbA1c, 1,5 anidroglicitol), perfil lipídico (colesterol total, HDL-c, triglicérides, LDL-c, não HDL-c), função renal (creatinina, ureia e ácido úrico), marcadores hepáticos (AST, ALT, GGT), albumina e proteínas totais.

Estes parâmetros bioquímicos foram quantificados em sistema automatizado Abbott - Architect Ci8200, no Laboratório de Imunoquímica da Unidade de Apoio Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR ou no equipamento Labmax 400 do laboratório escola da UFPR, empregando-se reagentes, calibradores e controles recomendados pelos fabricantes.

O índice aterogênico do plasma (AIP), o qual foi proposto inicialmente por Gaziano (1997) foi calculado através da razão $\log(\text{TG}/\text{HDL-c})$.

3.5 ANÁLISES MOLECULARES

3.5.1 Variabilidades genéticas em estudo

Na TABELA 2 são apresentadas as características dos genes e seus respectivos polimorfismos estudados.

TABELA 2 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS

Gene	Designação OMIM	Posição no cromossomo	Localização Região	Polimorfismo	Substituição dos alelos
<i>PTPN22</i>	*600716	1p13.2	Exon 14	rs2476601 C1858T R620W	C>T
<i>TYK2</i>	*176941	19p13.2	Exon 8	rs2304256	C>A

LEGENDA: rs: reference SNP; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*[®].

FONTE: Adaptado de (NCBI; OMIM).

3.5.2 Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico de cada amostra avaliada neste estudo foi extraído a partir do *pool* de leucócitos do sangue total pelo método de *salting out* modificado (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm através do equipamento Nanodrop/

Thermo Scientific. Foram excluídas as amostras que obtiveram concentração inferior a 20 ng/μL e quando a razão A_{260}/A_{280} foi menor que 1,7 ou superior a 2,1, pois isto caracterizou uma amostra de baixa qualidade ou contaminada.

A pureza da amostra do DNA é estimada pela razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} . Valores entre 1,6 e 1,9 foram considerados adequados (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

As amostras de DNA foram diluídas à concentração de 100 ng/μL (para a realização dos ensaios de PCR e PCR-RFLP) com água ultrapura estéril e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C. Para as análises de genotipagem com o sistema TaqMan®, estas amostras foram diluídas à concentração final de 20 ng/μL com água ultrapura estéril, e após análise as amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

3.5.3 Reação de PCR em tempo real com sondas fluorescentes (Taqman)

As reações foram realizadas conforme preconizado pelo fabricante do reagente (*Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos*) em equipamento de PCR em tempo real 7500 *Fast* (*Applied Biosystems*) disponível no laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR.

O preparo das placas de PCR em tempo real foi realizado em cabine de fluxo laminar, para evitar a contaminação dos reagentes. Cada placa continha 96 poços, sendo que em dois poços diferentes foram adicionados dois controles negativos (NTC: *no template control*) os quais continham apenas o *mix* de reação e água. E no restante da placa as amostras do grupo DM1 e controle foram ensaiadas de forma aleatória.

Para obtenção dos resultados foi utilizado o ensaio de discriminação alélica para genotipagem dos polimorfismos rs2476601 do gene *PTPN22* e rs2304256 do gene *TYK2* utilizando respectivamente as sondas fluorescentes C_16021387_20 e C_25473911_10. As sequências de nucleotídeos das sondas utilizadas no estudo estão no *site* da *Applied Biosystems* e são informadas através do código citado acima.

Na TABELA 3 estão descritas as condições de termociclagem e reagentes empregados na realização da PCR em tempo real.

TABELA 3 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Reagentes	Volume para reação de 8 µL
SNP genotyping assay mix (40x)	0,1 µL
Master Mix (2X)	3,0 µL
Água ultrapura estéril	1,9 µL
DNA (20 ng/µL)	3,0 µL
Ciclos térmicos	1 ciclo Pré-PCR 60°C → 30 seg. 1 ciclo 95°C → 10 min. 50 ciclos: 95°C → 15 seg. 60°C → 1 min e 30seg. 1ciclo Pós-PCR 60°C → 30 seg.

LEGENDA: Sonda TaqMan® SNP Genotyping Assays – Life Technologies, contendo um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), marcados com fluoróforos distintos (VIC e FAN). Master Mix contém DNA polimerase AmpliTaq Gold® ultrapura, desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), referência passiva ROX e tampão.

FONTE: O autor (2018).

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram analisadas com o teste “t” de Student (bidirecional), e os valores apresentados por média e desvio padrão. Para as variáveis sem distribuição normal (não paramétricas), as comparações foram analisadas com o teste “U” de Mann-Whitney, e os valores apresentados por mediana e intervalo interquartil (25%-75%).

Para as variáveis categóricas foram utilizados os testes de Chi-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fischer bidirecional, conforme apropriado. Enquanto que nos estudos de associação de variáveis genéticas com os parâmetros bioquímicos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), neste caso tendo o polimorfismo como variável classificadora. Para as análises de correlação, os genótipos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto de maior frequência), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto de menor frequência).

As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de Student bidirecional para amostras não pareadas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal passaram por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste U de Mann-Whitney, conforme apropriado.

A partir do programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) foi realizado o cálculo para a verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, cálculos das

frequências genotípicas e alélicas e do intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF).

Para as comparações das frequências alélicas com outras populações que foram analisadas para os respectivos genes deste estudo, foi considerado similar quando estava dentro do limite de 95% do intervalo de confiança (95%IC) e diferentes quando as frequências apresentaram acima ou abaixo do 95%IC.

A probabilidade (P) inferior a 0,05 ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

A análise de todos os dados estatísticos e a presença de outliers foi realizada através do programa Statistica para Windows 10.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos e clínicos analisados para os grupos em estudo (Controle saudável e DM1) é apresentada na TABELA 4.

TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS

Parâmetros	Controle (n=150)	DM1 (n=156)	P
Idade (anos)	44,0 (40-48)	45,0 (34-52)	0,549*
Gênero H/M	53/97	56/100	0,918**
Etnia (%)			
Euro-Brasileiro	ND	80,2	-
Afro-Brasileiro	ND	19,8	-
Peso (Kg)	75,1 ± 13,5	71,0 ± 15,4	0,014
Altura (cm)	166,2 ± 8,9	163,7 ± 9,7	0,017
IMC (Kg/m ²)	27,1 ± 4,3	25,7 ± 4,3	0,005
Tempo de DM (anos)	ND	15 ± 10	-
História familiar de Diabetes (%)	ND	70,1	-
Tabagismo (%)			
Não fumante	ND	51,6	-
Ex-fumante	ND	35,0	
Fumante	ND	13,4	
Uso de insulina (%)	ND	100	-
Hipertensão arterial sistêmica - HAS (%)	ND	49,7	-
Uso de antihipertensivo (%)	ND	36,3	-
Dislipidemia (%)	ND	40,1	-
Uso de hipolipemiantes (%)	ND	33,8	-
Uso de antihipertensivo e hipolipemiantes(%)	ND	29,1	-
Nefropatia (%)	ND	9,5	-

LEGENDA: Os resultados são apresentados como média ±1-Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) para variáveis sem distribuição normal. P, probabilidade teste t-Student bidirecional. P, probabilidade, teste U de Mann-Whitney. **Teste do Chi-quadrado. P<0,05 é significativo e destacado em negrito. Abreviações: H, homens; M, mulheres; DM1, *Diabetes mellitus* tipo 1; Controle, adultos saudáveis; IMC, Índice de Massa Corporal; ND, Dado não disponível.

FONTE: O autor (2018).

4.1.1 Sexo, Idade e etnia

Os grupos controle e DM1 foram pareados por idade e gênero, assim não houve diferença significativa entre as idades ($P=0,549$) e houve proporção entre homens e mulheres ($P=0,918$).

O grupo DM1 foi composto por 80,2% de indivíduos Euro-Brasileiros e os demais indivíduos deste grupo foram Afro-Brasileiros. Estes dados estão em acordo com os dados disponíveis para a população de Curitiba e região, onde a maioria é de origem Euro-Brasileira, correspondendo a 80,3% (CENSO, 2010). No grupo controle esta informação não estava disponível, porém ambos os grupos são provenientes da mesma região demográfica.

4.1.2 Índice de massa corpórea (IMC)

O índice de massa corpórea (IMC) apresentou diferença significativa ($P=0,005$) entre os grupos deste estudo. Porém ambos os grupos apresentaram a média do IMC acima da normalidade $27,1 \text{ kg/m}^3$ para os saudáveis e $25,7 \text{ kg/m}^3$ para DM1. Ressalta-se que um adulto para possuir peso adequado deve apresentar IMC entre $18,5 \text{ kg/m}^3$ e 25 kg/m^3 (WHO, 2016).

Tem se associado esse aumento de peso entre indivíduos com DM1 ao efeito da insulinoaterapia, hormônios ou também do aumento na ingesta calórica evitando os quadros de hipoglicemia (CONWAY *et al.*, 2010). Estudos clínicos tem demonstrado que tratamento intensivo destes pacientes aumenta o risco de sobrepeso (CONWAY *et al.*, 2010; PURNELL *et al.*, 2013).

4.1.3 Histórico familiar de DM

Dos pacientes estudados 70,1% relataram histórico familiar (primeiro e segundo grau) para DM1 ou DM2, demonstrando que o histórico familiar é um forte preditor de risco para diabetes (LI, H. *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2001; DAHLQUIST *et al.*, 2011; USHER-SMITH *et al.*, 2015). Estes dados foram semelhantes a um estudo realizado por Barone e colaboradores (2008) o qual observou que a prevalência de histórico familiar de DM1 foi de 20% e de DM2 foi de 66,2% entre adultos com DM1.

Pacientes com DM1 e histórico familiar de DM2 tem sido associado a um início tardio da doença e mais complicações cardiovasculares. Enquanto que os pacientes com DM2 e história familiar de DM1 apresentam menor índice de massa corporal, menos complicações cardiovasculares e concentrações mais baixas de peptídeo-C (BARONE *et al.*, 2008).

4.1.4 Tabagismo

No Brasil, apesar da real prevalência de tabagismo entre indivíduos com diabetes ser desconhecida, é possível supor que esteja em torno de 10% (SBD, 2016), demonstrando semelhança com o estudo presente onde a frequência de fumantes no grupo DM1 foi de 13,4%. Dados sobre o consumo de tabaco pelo grupo controle não estavam disponíveis para comparação.

Os mecanismos que explicam a relação entre o tabagismo e o desenvolvimento de diabetes não são totalmente compreendidos. Substâncias presentes na fumaça do tabaco desencadeiam a produção de radicais livres, interferem na homeostase e no funcionamento adequado do endotélio vascular, e também aumentam a inflamação e o estresse oxidativo. O consumo de tabaco danifica diretamente a função das células β pancreáticas, sendo um preditor da progressão da intolerância à glicose o que aumenta o risco de desenvolver diabetes (SLIWINSKA-MOSSON; MILNEROWICZ, 2017).

O tabagismo ativo está associado a riscos significativamente maiores de mortalidade e de complicações cardiovasculares entre pessoas com diabetes, enquanto que a supressão do tabagismo foi associada a menores riscos de complicações (PAN *et al.*, 2015). Muitos pacientes continuam a fumar mesmo após o diagnóstico de diabetes, e estudos relataram que a taxa de sucesso nas intervenções de interrupção do tabagismo entre estes pacientes é em torno de 20% (TONSTAD, 2009). A frequência de ex-fumantes para este estudo foi de 35% para o grupo DM1, o que demonstrou conscientização sobre os riscos de consumir o tabaco e apresentar a doença.

4.1.5 Hipertensão e dislipidemia

A hipertensão arterial constitui um dos fatores de risco cardiovascular mais prevalente em todo o mundo e está associada ao DM1 e ao DM2, pois apresenta frequência 2,4 vezes maior nos indivíduos com esta doença (SBD, 2016). Todas as pessoas com diabetes que possuem idade superior a 40 anos apresentam risco de desenvolver doença cardiovascular (VELLA; PETRIE, 2015).

Estudos avaliando a prevalência de hipertensão em pacientes com DM1 mostraram uma variação entre 11% e 59% (CHILLARON *et al.*, 2011), estando em consonância com nosso estudo onde aproximadamente 50% dos pacientes com DM1 reportaram hipertensão.

O tratamento da hipertensão no DM1 é clinicamente relevante, uma vez que a hipertensão é um fator de risco independente para o desenvolvimento e progressão de complicações micro e macroangiopáticas (CHILLARON *et al.*, 2011), porém observa-se que dos pacientes estudados somente 36,3% deles utilizavam medicamentos antihipertensivos.

Um fator de risco significativo para aterosclerose e doenças cardiovasculares em indivíduos com DM é a dislipidemia (MAAHS *et al.*, 2008), a qual é caracterizada por concentrações reduzidas de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e aumento do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e triglicérides (BULUT; DEMIREL; METIN, 2017). Os componentes da dislipidemia, os quais se caracterizam por anormalidades quantitativas e qualitativas, estão relacionados principalmente à resistência à insulina (ATHYROS *et al.*, 2018).

Uma revisão bibliográfica realizada no Brasil com dados de 1990 até 2015 relatou que menos de 30% dos pacientes com DM1 estavam recebendo tratamento para dislipidemia agressiva e hipertensão, embora as diretrizes de prática clínica recomendem o manejo destas condições clínicas (COUTINHO; SILVA JUNIOR, 2015). Nosso estudo demonstrou dados semelhantes, onde 29% dos pacientes que apresentavam DM1 utilizavam concomitantemente medicamentos hipolipemiantes e antihipertensivos. Isto demonstra que uma parte dos pacientes não está atingindo os objetivos do tratamento, já que aproximadamente 50% dos pacientes apresentam hipertensão e 40% dislipidemia.

4.1.6 Nefropatia

A nefropatia é considerada uma das principais causas de morbidade e um dos principais determinantes de mortalidade em pacientes com DM1 e DM2. A nefropatia diabética é definida como um aumento na excreção urinária de albumina e declínio progressivo da função renal, refletido pela elevada concentração plasmática de creatinina e redução da taxa de filtração glomerular (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013).

Esta complicação crônica afeta 20% a 30% das pessoas com DM1 ou DM2, sendo responsável aproximadamente por metade dos novos casos de insuficiência renal nos indivíduos em diálise (TSCHIEDEL, 2014). Nosso estudo revelou que 9,5% dos pacientes com DM1 apresentaram nefropatia, estando abaixo da porcentagem relatada anteriormente.

Contudo, alguns indivíduos não desenvolvem nefropatia nos primeiros 10 a 15 anos da doença apesar do controle glicêmico inadequado (QUINN *et al.*, 1996). Este dado demonstrou semelhança com o estudo presente que relatou a média de tempo de DM1 de 15 anos e baixo relato de nefropatia.

Sugere-se que haja um fator genético predisponente, além dos fatores de risco habituais, como hiperglicemia, hipertensão arterial e dislipidemia que contribuem para a nefropatia (TSCHIEDEL, 2014).

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A estatística descritiva dos parâmetros bioquímicos para os grupos em estudo (Controle saudáveis e DM1) é apresentada na TABELA 5.

TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=150)	DM1 (n=156)	P
Glicemia (mg/dL)	95,0 (84-105)	179,5 (107-247)	<0,001*
HbA1c (%)	5,4 ± 0,3	8,7 ± 2,0	<0,001
1,5 AG (µg/mL)	108,3 (102-114)	4,3 (2,4-5,9)	<0,001*
Colesterol Total (mg/dL)	175,0 (159-195)	171,0 (152-200)	0,341*
HDL-c (mg/dL)	54,0 (45-62)	50,0 (41-63)	0,259*
Triglicérides (mg/dL)	137 (88-174)	89,0 (68-134)	<0,001*
LDL-c (mg/dL)	93,2 (81-112)	98,8 (78-120)	0,178*
não HDL-c (mg/dL)	122,0 (106-147)	119,5 (99-140)	0,542*
LOG (TG/HDL-c)	0,91 ± 0,65	0,69 ± 0,77	<0,001
AIP	0,03 ± 0,28	-0,05 ± 0,33	<0,001
Proteína total (g/dL)	6,9 (6,6-7,2)	8,2 (7,4-8,7)	<0,001*
Albumina (g/dL)	3,9 (3,8-4,0)	4,1 (3,8-4,3)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	4,6 (3,7-5,4)	3,7 (2,9-4,8)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,57 (0,48-0,67)	0,85 (0,8-1,0)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	23,0 (20-27)	32,0 (25-40)	<0,001*
AST (mg/dL)	21,0 (17-24)	16,0 (12-21)	<0,001*
ALT (mg/dL)	14,0 (11-19)	17,0 (9-22)	0,468*
GGT (mg/dL)	27,0 (20-41)	24,0 (15-40)	0,043*

LEGENDA: Os resultados são apresentados como média ±1-Desvio Padrão ou mediana (intervalo interquartil, 25%-75%). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. P*, probabilidade teste U de Mann-Whitney. O grupo DM1 estava em jejum, enquanto o grupo controle não estava em jejum para realização da glicemia. AIP: índice aterogênico do plasma com parâmetros calculados em mmol/L.

FONTE: O autor (2018).

4.2.1 Perfil glicêmico

Os marcadores de perfil glicêmico foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Os dados analisados através da glicemia acima de 130 mg/dL, HbA1c >7% e 1,5AG <10 µg/mL (SBD, 2017; ADA, 2018), demonstraram que o grupo DM1 apresentou um controle glicêmico inadequado.

No presente estudo a média de HbA1c (8,7%) para o grupo doente foi semelhante a um estudo multicêntrico realizado em 20 cidades brasileiras também com adultos DM1 que apresentaram a média de HbA1c de 9,1% (GOMES *et al.*, 2012). Tal estudo relatou que apenas 11,6% dos pacientes com DM1 atingiram a meta adequada <7% para o parâmetro de HbA1c, refletindo desta forma problemas dos pacientes com ajustes na dose da insulina e educação deficiente sobre a doença (GOMES *et al.*, 2012; SBD, 2016).

O 1,5-anidroglicitol (1,5AG) é um marcador de controle glicêmico, o qual em condições de normoglicemia é totalmente reabsorvido pelos rins (MCGILL *et*

al., 2004). Porém, quando a glicemia ultrapassa o limiar renal (~ 180 mg/dL), ocorre uma competição entre o 1,5-AG e a glicose pela reabsorção tubular proximal, sendo a reabsorção da glicose favorecida, o que acarreta a diminuição da reabsorção e das concentrações séricas de 1,5-AG (SEOK *et al.*, 2015).

No estudo presente, a concentração de 1,5-AG em indivíduos com DM1 foi 4,3 µg/mL (2,4-5,9), caracterizada como abaixo do ideal, pois a faixa normal de 1,5-AG é acima de 10 µg/mL. Estes achados foram similares ao descrito por Seok e colaboradores (2015), o que pode ser sugestivo de controle glicêmico inadequado nos pacientes DM1.

A dificuldade em obter um controle glicêmico adequado nos pacientes que possuem DM1 através de cuidados de rotina é descrita em muitos estudos observacionais em várias partes do mundo (LECOMTE *et al.*, 2008; SKEIE *et al.*, 2009; SCHWANDT; BEST; BIESTER, 2017).

4.2.2 Perfil lipídico e análise do índice aterogênico do plasma Log (TG/HDL-c)

O perfil lipídico abrange a quantificação das concentrações séricas do colesterol total (CT), colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c), triglicérides (TG), colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e colesterol não HDL-c.

O grupo DM1 apresentou perfil lipídico conforme as metas terapêuticas estabelecidas pelas Diretrizes Brasileiras de Dislipidemia para os pacientes diabéticos que possuem risco intermediário para doenças cardiovasculares (Colesterol total <190 mg/dL; HDL-c >40 mg/dL; Triglicérides <150mg/dL; LDL-c <100 mg/dL e n-HDL-c <130 mg/dL) (FALUDI *et al.*, 2017).

O comportamento dos grupos em relação ao perfil lipídico apresentou concentrações semelhantes ($P>0,05$) para os parâmetros bioquímicos CT, HDL-c, LDL-c e não HDL-c. Somente a dosagem sérica dos triglicérides foi significativamente menor no grupo DM1 ($P<0,001$) do que no grupo controle, o que poderia ser justificado pela ausência de jejum no grupo controle, o que pode ter afetado positivamente as concentrações de triglicérides, e o uso de terapia hipolipemiante pelos pacientes com DM1. Estudos realizados nos Estados Unidos envolvendo 1416 adultos (WADWA *et al.*, 2005) e no Brasil (ARCANJO *et al.*, 2005)

também demonstraram que pacientes com DM1 apresentaram melhor perfil lipídico em comparação a adultos sem a doença.

As concentrações de HDL-c estavam conforme o desejável ($HDL \geq 40$) para o grupo DM1, embora que estes pacientes ainda apresentem um maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares do que a população em geral (GROOP, P. H. *et al.*, 2007).

Estudos mencionaram que os lipídios em indivíduos com DM talvez sejam mais aterogênicos e os possíveis mecanismos incluem as diferenças no tamanho das partículas de lipoproteínas, a oxidação do LDL-c e o aumento do transporte de LDL-c transvascular em pacientes com DM1 (MAAHS *et al.*, 2008).

A utilização do não HDL-c representa o teor de colesterol presente em todas as lipoproteínas aterogênicas circulantes no plasma, especialmente em indivíduos com TG elevado (FALUDI *et al.*, 2017). Interessante ressaltar que em uma análise de dados combinados de 68 estudos, o não HDL-c foi o melhor preditor entre todas as medidas de colesterol, tanto para eventos de doença arterial coronariana como para derrames, sendo assim considerado um adequado marcador de risco em estudos de prevenção primária e secundária (VIRANI, 2011).

Na análise do perfil lipídico, os principais parâmetros bioquímicos discriminadores entre os grupos foram as concentrações séricas de triglicérides e o índice aterogênico do plasma (AIP), calculado pelo log da razão de (TG/HDL-c). Estudos analisaram que a proporção de triglicerídeos para HDL-c foi um forte preditor de infarto do miocárdio, pois os valores de AIP aumentam conforme aumenta o risco cardiovascular (DOBIASOVA, 2006; VIEIRA *et al.*, 2011). Sugere-se que os valores de AIP abaixo de 0,11 estejam associados a baixo risco de doença cardiovascular, de 0,11 a 0,21 risco intermediário e superiores a 0,21 associado a risco aumentado (NIROUMAND *et al.*, 2015).

Nosso estudo demonstrou baixo risco de doença cardiovascular para os grupos estudados, pois ambos apresentaram razão inferior à 0,11. Conforme a literatura, o AIP está mais relacionado com pacientes DM2. Segundo uma meta-análise realizada com 15 estudos, indivíduos com DM2 apresentaram valores de AIP significativamente mais elevados, em comparação a indivíduos sem a doença (ZHU; DENG; LEI, 2015). Em outro estudo foi observado forte associação entre AIP e a relação urinária albumina/creatinina em mulheres DM2, em contraste com mulheres DM1 que apresentaram AIP abaixo de 0,11 (-0,03) (PITHOVA *et al.*,

2016). A relação albumina/creatinina é um bom teste de triagem para microalbuminúria. Considerado um marcador precoce de lesão glomerular em indivíduos com diabetes, a microalbuminúria duplica o risco de um evento cardiovascular em pacientes com DM2 (KARALLIEDDE; VIBERTI, 2004).

4.2.3 Perfil renal

Os marcadores de função renal, creatinina e ureia, apresentaram concentrações séricas significativamente maiores ($P < 0,001$) no grupo DM1 quando comparado ao grupo controle. Porém os valores encontram-se dentro do intervalo de referência, sugerindo que os pacientes em estudo não apresentaram alteração relevante na função renal. Estes achados foram similares ao descrito por Januszewski e colaboradores (2016) que também demonstraram concentrações significativamente maiores de creatinina ($P = 0,01$) e ureia ($P < 0,001$) no grupo DM1.

Concentrações séricas de ureia e creatinina podem ser usados como marcadores de dano renal em pessoas com diabetes e são os parâmetros mais aceitos para avaliar a situação da doença renal crônica (BAMANIKAR; BAMANIKAR; ARORA, 2016). Estes marcadores são bons indicadores para a avaliação clínica da taxa de filtração glomerular e o aumento sérico é indicativo de disfunção renal (PANDYA; NAGRAJAPPA; RAVI, 2016).

4.2.4 Proteína total e albumina

A concentração plasmática de proteína total e a albumina dos pacientes com DM1 foi significativamente superior ($P < 0,001$) quando comparada ao grupo controle, porém as concentrações encontradas para estes parâmetros bioquímicos estão de acordo com os intervalos de referência.

A albumina é a mais abundante proteína plasmática, perfazendo um total de 50% das proteínas totais no soro humano, sendo responsável por 80% da pressão coloidosmótica (SANTOS *et al.*, 2004). É freqüentemente definida como um indicador de estado nutricional e/ou inflamatório, logo pode ser sugerido que os indivíduos analisados no estudo presente não apresentaram desnutrição protéica.

4.2.5 Ácido úrico

Pacientes com DM1 apresentaram concentrações séricas de ácido úrico significativamente menores ($P < 0,001$) em comparação ao grupo controle (3,7 *versus* 4,6 mg/dl), apesar disso estes valores estiveram dentro do intervalo de referência. Este achado é consistente com estudo anterior (GOLEMBIEWSKA *et al.*, 2005), o qual menciona que baixas concentrações de ácido úrico em pessoas com diabetes pode ocorrer devido à excreção excessiva de ácido úrico associado a glicosúria por mecanismo não totalmente esclarecido.

Porém, em um estudo transversal com 670 pacientes com DM1, a mediana da dosagem do ácido úrico foi discretamente maior (5,0 mg/dl) ao estudo em tela. As concentrações mais elevadas deste analito foram associados à presença de insuficiência renal e outras complicações diabéticas (PILEMANN-LYBERG *et al.*, 2018). Concentrações elevadas de ácido úrico têm sugerido ser um fator de risco para doença renal crônica, hipertensão e doença cardiovascular na população em geral e em pessoas diabéticas (KUWABARA *et al.*, 2017).

4.2.6 Perfil hepático

A concentração sérica da aspartato amino transferase (AST) foi significativamente inferior no grupo DM1, enquanto que as concentrações de alanina amino transferase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT) não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Contudo todos os valores para estes parâmetros apresentaram dentro do intervalo de referência.

As aminotransferases são consideradas indicadores hepatocelulares, enquanto que a GGT reflete a função do trato biliar. ALT é encontrada principalmente no fígado, enquanto que AST e GGT são marcadores menos específicos da função hepática, pois são encontradas em outros tecidos além do fígado (VOZAROVA *et al.*, 2002).

Conforme um estudo de Leeds e colaboradores (2009) a atividade aumentada de ALT é significativamente mais comum em pacientes com DM2 e parece estar associada a fatores de risco relacionados à doença hepática gordurosa não alcoólica enquanto que em pacientes DM1 esta relacionada com

controle glicêmico inadequado, idade avançada e concentrações elevadas de triglicérides.

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

As frequências genotípicas e alélicas dos genes *PTPN22* e *TYK2* para os polimorfismos em estudo nos grupos de indivíduos controle saudáveis e DM1 estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$), e apresentadas respectivamente nas TABELAS 6 e 8.

4.3.1 Polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22*

As frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs2476601 estão relatadas na TABELA 6.

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2476601 DO GENE *PTPN22*

Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controle (n=150)	DM1 (n=156)	P
rs2476601	C/C	131 (87%)	137 (87,8%)	0,345*
C>T	C/T	19 (13%)	17 (10,9%)	
<i>PTPN22</i>	T/T	0	2 (1,3%)	
Frequência do Alelo (95%IC)	T	6,3 [4 -9]	6,7 [4 -10]	0,842*
Dominante	CC / CT+TT	131/19	137/19	0,965**
Recessivo	CC+CT / TT	150/0	154/2	0,495**

LEGENDA: Genótipos descritos em n %; 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P*, probabilidade, teste de χ^2 ; P**, probabilidade, teste de Yates.

Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (teste de χ^2). Polimorfismo rs2476601 grupo controle ($P=0,407$) e DM1 ($P=0,099$).

FONTE: O autor (2018).

Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos ($P=0,345$) e frequências alélicas ($P=0,842$) para o polimorfismo em questão entre os grupos estudados. Portanto, sugere-se que o rs2476601 do gene *PTPN22* não está associado ao DM1 na população em estudo, em discordância com outros (OKRUSZKO *et al.*, 2012; LEE; SONG, 2013; RODRIGUEZ *et al.*, 2015; ABDELRAHMAN *et al.*, 2016; ABBASI *et al.*, 2017), inclusive estudos Brasileiros realizados em crianças e adolescentes com DM1 (CHAGASTELLES *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2015; WELTER *et al.*, 2018).

Foi mostrado que o genótipo de risco DR3/DR4-DQ302 para o DM1 se apresenta com maior frequência em indivíduos com início da doença mais jovens (CAILLAT-ZUCMAN *et al.*, 1992). Em contraste, relatos dos efeitos da interação idade no diagnóstico e *loci* não-HLA são contraditórios, com relatórios positivos em grande parte confinados a estudos envolvendo número amostral pequeno (TODD *et al.*, 2007; WANG, H. *et al.*, 2010; ESPINO-PAISAN *et al.*, 2011b, 2011a). Com relação ao polimorfismo rs2476601, alguns estudos reportam não ter relação com a idade do diagnóstico (TODD *et al.*, 2007; CHAGASTELLES *et al.*, 2010; HOWSON; ROSINGER; *et al.*, 2011; HOWSON *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2015), contudo nosso grupo encontrou associação deste polimorfismo com o DM1 em crianças e adolescentes (WELTER *et al.*, 2018) e não encontrou em indivíduos que tiveram o diagnóstico da doença após 18 anos de idade, estudo em tela. Tavares e colaboradores (2015) avaliando uma população Brasileira verificaram que a média de idades para os genótipos C/C e C/T+T/T no modelo dominante para o polimorfismo rs2476601 foi 7,87 e 6,10, respectivamente ($P=0,025$). Mas a correlação deixou de ser significativa após correção de Bonferroni. Embora, Howson e colaboradores (2012) também não tenham encontrado relação deste polimorfismo com idade de diagnóstico da doença, encontraram interação gene-gene, associação entre o genótipo DR3/DR4-DQB1*0302 e polimorfismo rs2476601 ($P=7,82 \times 10^{-6}$). Desta forma seria interessante a genotipagem do HLA nestes pacientes, uma limitação deste trabalho.

O alelo T está praticamente ausente nas populações Asiática (0,3%) e Africana (1,7%) (dbSNP, 2018). Conforme Burn e colaboradores (2011) o polimorfismo rs2476601 provavelmente surgiu no final da evolução humana em alguma população européia. E isto é possível observar a partir da TABELA 7, onde as maiores frequências do alelo T no SNP rs2476601 foi relatada principalmente na Europa. Sugere-se que a variante T originou-se na região nordeste da Europa e posteriormente foi espalhada e/ou positivamente selecionada (CHAGASTELLES *et al.*, 2010).

A TABELA 7 demonstra as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo rs2476601 no presente estudo e em outras populações. No estudo em tela a frequência do alelo T no rs2476601 para o grupo DM1 foi de 6,7% (95%IC, 4-10). Este dado demonstrou similaridade à população da região Sul do Brasil em crianças DM1 (9,9%), à região Nordeste do Brasil (8,0%) e à população

Italiana (4,9%). Enquanto que a frequência do alelo T no grupo controle (6,3%, 95%IC, 4-9) foi similar às populações Brasileira da região do Rio Grande do Sul (5,2%), Italiana (5,9%), Espanhola (6,7%) e Alemã (8,0%). A frequência de ambos os grupos foi superior a relatada para os Africanos (0,3%) e Asiáticos (1,7%).

TABELA 7 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2476601 DO GENE *PTPN22* COM DADOS DA LITERATURA

<i>PTPN22</i> rs2476601			Genótipo (%)			Alelo (%)
População	Características	N	CC	CT	TT	T
Presente estudo	DM1	156	87,8	10,9	1,3	6,7
	Controle	150	85,0	15,0	0	6,3
Brasileiros	DM1	211	72,0	26,5	1,4	14,7
(Rio Grande do Sul)	Controle	241	89,6	10,4	0	5,2
(CHAGASTELLES <i>et al.</i> , 2010)						
Brasileiros	DM1	205	85,0	15,0	0	8,0
(Região Nordeste)	Controle	308	94,0	6,0	0	3,0
(TAVARES <i>et al.</i> , 2015)						
Brasileiros	DM1	151	80,8	18,5	0,7	9,9
(Região Sul)	Controle	169	93,5	5,9	0,6	3,6
(WELTER <i>et al.</i> , 2018)						
Italianos	DM1	174	90,8	8,6	0,6	4,9
	Controle	214	95,8	4,2	0	2,1
Americanos	DM1	294	65,6	30,6	3,7	19,0
(BOTTINI <i>et al.</i> , 2004)	Controle	395	77,7	21,3	1,0	11,6
Franceses	DM1	885	70,4	27,5	2,1	29,6
(CHELALA <i>et al.</i> , 2007)	Controle	442	82,1	16,5	1,4	17,9
Croatas	DM1	102	46,1	50	3,9	28,9
(KOROLIJA <i>et al.</i> , 2009)	Controle	193	77,1	22,4	0,5	11,7
Ucranianos	DM1	296	63,2	31,4	5,4	21,1
(FEDETZ <i>et al.</i> , 2006)	Controle	242	72,8	26,4	0,8	14,1
Poloneses	DM1	175	68,6	25,1	6,3	18,9
(OKRUSZKO <i>et al.</i> , 2012)	Controle	151	75,5	23,8	0,7	12,6
Italianos	DM1	216	-	-	-	11,6
(SACCUCCI <i>et al.</i> , 2008)	Controle	271	-	-	-	5,9
Espanhóis	DM1	316	79,7	18,7	1,6	10,9
(SANTIAGO <i>et al.</i> , 2007)	Controle	554	87,2	12,3	0,5	6,7
Alemães	DM1	70	78,6	21,4	0	10,7
(DULTZ <i>et al.</i> , 2009)	Controle	100	86	12	2	8,0
Brasileiros	Saudáveis	200	-	-	-	7,3
(Região Sul)	Saudáveis	40	-	-	-	7,9
(LINS <i>et al.</i> , 2010)						
HapMap-CEU	Saudáveis	222	-	-	-	11,7
(dbSNP, 2018)						
HapMap-TSI	Saudáveis	172	-	-	-	6,9
(dbSNP, 2018)						
Europeus	Saudáveis	1066	-	-	-	9,4
Africanos	Saudáveis	1322	-	-	-	0,3
Asiáticos	Saudáveis	168	-	-	-	1,7
(dbSNP, 2018)						

LEGENDA: Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (T) que são semelhantes ao Intervalo de Confiança (95%). CEU: residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. TSI: Toscana na Itália. (dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

FONTE: O autor (2018).

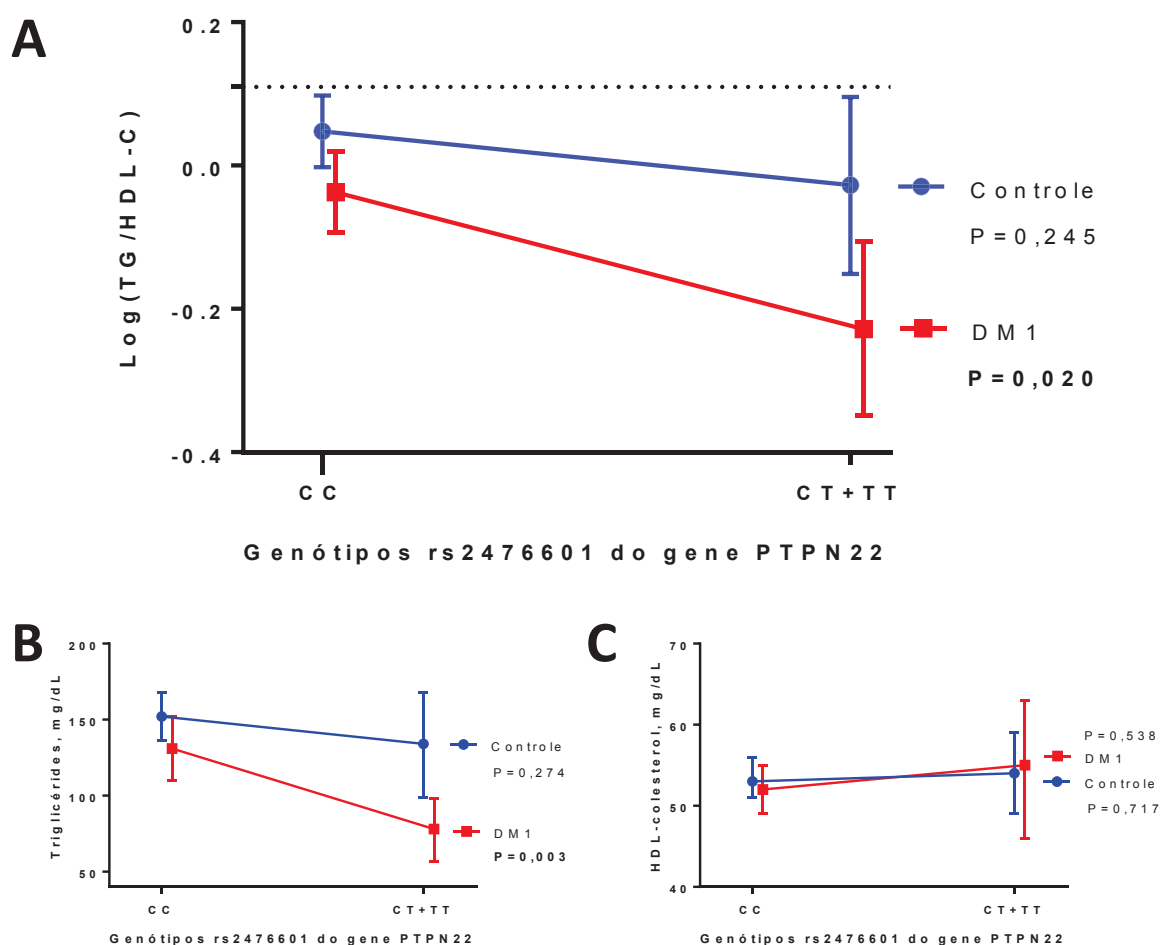
Observou-se variabilidade genética nas duas populações locais do grupo controle pertencente ao estudo realizado por Welter e colaboradores (2018) e ao presente estudo. O grupo controle crianças apresentou 3,6% de frequência do alelo T, estando abaixo do intervalo de confiança (95% IC, 4-9) analisado no estudo em tela. Nos dois estudos mencionados não foi possível comparar a etnia entre os grupos, porque esta informação não estava disponível entre os participantes dos grupos controle.

Populações altamente misturadas, como populações urbanas do Brasil são propensas a resultados diferentes em estudos de associação genética devido às diferentes proporções de mistura e sua correlação com dados genotípicos e fenotípicos. Pelo fato do polimorfismo rs2476601 ser um marcador específico da população, os estudos em população misturada pode requerer a informação dos marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) para controlar o fator de confusão de estratificação populacional (LINS *et al.*, 2010).

A busca por associação dos genótipos do rs2476601 do gene *PTPN22* com as concentrações dos parâmetros bioquímicos e dos dados clínicos evidenciou correlação significativa ($P < 0,05$) entre esse polimorfismo com o AIP (índice aterogênico do plasma), conforme ilustrado na FIGURA 9.

De acordo com a FIGURA 9A, os indivíduos DM1 com os genótipos CT+TT apresentaram diferença significativa ($P = 0,020$) em relação aos indivíduos que possuíam o genótipo CC para a análise do AIP, representado por $\text{Log}(\text{TG}/\text{HDL-c})$. Analisando separadamente os componentes do AIP, conforme a FIGURA 9B, a concentração dos triglicérides apresentou um valor significativamente menor nos indivíduos diabéticos que possuem os genótipos CT+TT. A partir de uma análise detalhada foi observado que dos 19 indivíduos que apresentaram o alelo T, 52% usavam medicamentos hipolipemiantes, o que auxiliou na redução da concentração plasmática dos triglicérides e o restante apresentavam concentrações adequadas. Enquanto que as concentrações de HDL-c não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados (FIGURA 9C).

FIGURA 9 - GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs2476601 E MARCADORES DO PERFIL LIPÍDICO



Comparações entre concentrações da razão $\log(TG/HDL-c)$, Fig A; triglicérides, Fig B, e HDL-colesterol, Fig C com os genótipos CC e CT+TT do polimorfismo rs 2476601, em pessoas com DM1 e indivíduos saudáveis (Controle). Os pontos representam a média e as barras verticais 95% do intervalo de confiança. A linha tracejada na Fig A representa a razão 0,11 critério para risco baixo para doença cardiovascular, Valores de P, teste t-Student (bidirecional) e para triglicérides, teste U de Mann-Whitney.

FONTE: O autor (2018).

Em um estudo com 612 pacientes espanhóis de ancestralidade caucasiana com artrite reumatóide não foi encontrado associação do alelo T com risco de eventos cardiovasculares (PALOMINO-MORALES *et al.*, 2010).

Contudo, o resultado de outro estudo prospectivo com 2268 jovens saudáveis sugeriu que a presença do alelo T, o qual auxilia a predispor a auto-imunidade, foi associada com diversos fatores de risco para aterosclerose (IMC, circunferência da cintura, concentrações séricas de proteína C-reativa e triglicérides), o que pode favorecer ao aumento de risco cardiovascular (PERTOVAARA *et al.*, 2007). Apesar da ausência de evidência de outros estudos para comprovação do mecanismo, a hipótese do estudo de Pertovaara e

colaboradores (2007) foi que o efeito biológico do alelo T de PTPN22 poderia causar uma reação auto-imune contra certos antígenos específicos para a patogênese da aterosclerose e assim consequentemente aumentar o risco cardiovascular.

Portanto, com base na literatura e na elevada dispersão dos dados (baseado em 95% do intervalo de confiança), sugere que os resultados do estudo em tela sejam decorrentes de variações ao acaso, possivelmente associadas ao tamanho amostral pequeno.

4.3.2 Polimorfismo rs2304256 do gene *TYK2*

As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos (TABELA 8).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2304256 DO GENE *TYK2*

Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controle (n=150)	DM1 (n=156)	P
rs2304256	C/C	83 (55,3)	103 (66)	0,156
C>A	C/A	60 (40)	45 (28,8)	
<i>TYK2</i>	A/A	7 (4,7)	8 (5,2)	
Frequência do Alelo (95%IC)	A	24,7 [20-35]	19,6 [14 - 27]	0,127
Dominante	CC / CA+AA	83/67	103/53	0,055
Recessivo	CC+CA / AA	143/7	148/8	0,821

LEGENDA: Genótipos descritos em n %; 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de χ^2 . Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (teste de χ^2). SNP rs2304256 grupo controle (P=0,350) e DM1 (P=0,299).

FONTE: O autor (2018).

Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) na comparação dos genótipos e frequências alélicas para o polimorfismo rs2304256 do gene *TYK2* entre os grupos $P=0,156$ e $P=0,127$, respectivamente (TABELA 8). Logo, o polimorfismo rs2304256 do gene *TYK2* não foi associado ao DM1 na amostra em estudo.

Na análise de estudos sobre este polimorfismo, somente um artigo (WALLACE *et al.*, 2010) foi encontrado avaliando a associação entre o rs2304256 do gene *TYK2* e DM1. A frequência do alelo A foi maior nos ingleses (29,4%) com DM1 do que no presente estudo (19,6%, 95% IC, 14-27) e semelhante a um estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa em crianças Brasileiras (24,2%).

Foi encontrada associação deste polimorfismo com outras doenças auto-imunes, como Lúpus eritematoso sistêmico (SLE), Lúpus eritematoso cutâneo (SLEc) e Doença de Crohn (HELLQUIST *et al.*, 2009; SATO, K. *et al.*, 2009; JARVINEN *et al.*, 2010).

Contudo, existe controvérsia na literatura em relação às associações do polimorfismo rs2304256 com doenças autoimunes. No estudo de Wallace e colaboradores (2010) este polimorfismo foi considerado um fator de proteção para o DM1 (OR=0.86, 95% IC=0.82–0.90). Foi sugerido que o polimorfismo diminuiu a função biológica do TYK2, e consequentemente diminuiu a via de sinalização intracelular de IFN α e interleucinas e assim atenuou a auto-imunidade contra as células β pancreáticas.

Nagafuchi e colaboradores (2015) realizaram um estudo com uma variante na região promotora do gene *TYK2* e concluíram que este polimorfismo diminuiu a atividade da quinase e consequentemente aumentou o risco de DM1 (OR=2.4, 95% IC=1.2- 4.6) e DM2 (OR=2.1, 95% IC=1.1- 4.1) induzido por vírus. Foi sugerido que a variante do promotor *TYK2* conferiria risco para o desenvolvimento de diabetes devido ao aumento da suscetibilidade à infecção viral e assim ocorreria uma possível indução de auto-imunidade contra as células β pancreáticas desencadeada por infecções virais. Os dados deste estudo foram obtidos na população Japonesa, menos propensa ao DM1 do que outros grupos étnicos, assim o efeito deste polimorfismo na região promotora do gene *TYK2* e consequente efeito sobre a atividade da proteína TYK2 precisaria ser verificada em outras populações.

No estudo de Sigurdsson e colaboradores (2005) o rs2304256 diminuiu a suscetibilidade para LES em populações Caucasianas, porém em outros estudos como o realizado em famílias do Reino Unido (GRAHAM; AKIL; VYSE, 2007) e na população Asiática (KYOGOKU *et al.*, 2009; LI, P. *et al.*, 2011), não houve associação deste polimorfismo com LES.

Este polimorfismo diminuiu a suscetibilidade para esclerose sistêmica (LOPEZ-ISAC *et al.*, 2016), enquanto que para artrite reumatoide (SUAREZ-GESTAL; CALAZA; DIEGUEZ-GONZALEZ; *et al.*, 2009) não houve associação.

TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2304256 DO GENE *TYK2* COM DADOS DA LITERATURA

TYK2 rs2304256			Genótipo (%)			Alelo (%)
População	Características	N	CC	CA	AA	A
Presente estudo	DM1	156	65,5	28,9	5,6	19,6
	Controle	150	56,2	39,2	4,6	24,7
Brasileiros (WELTER, 2018)	DM1	151	57,0	38,0	5,0	23,4
	Controle	169	58,0	37,0	5,0	24,2
Ingleses (WALLACE <i>et al.</i> , 2010)	DM1	3838	-	-	-	29,4
	Controle	8290	-	-	-	29,3
Brasileiros (PELUSO <i>et al.</i> , 2013)	Endometriose	275	57,1	36,4	6,5	24,7
	Controle	307	59,0	34,8	6,2	23,6
Ascendência Européia (LOPEZ-ISAC <i>et al.</i> , 2016)	Esclerose sistêmica	7103	-	-	-	24,6
	Controle	12220	-	-	-	27,9
Espanhóis (SUAREZ-GESTAL; CALAZA; DIEGUEZ-GONZALEZ; <i>et al.</i> , 2009)	Artrite reumatoide	1635	-	-	-	25,8
	Controle	1906	-	-	-	26,9
Chineses (LI, P. <i>et al.</i> , 2011)	LES	669	-	-	-	41,3
	Controle	2193	-	-	-	42,4
Japoneses (KYOGOKU <i>et al.</i> , 2009)	LES	69	36,2	44,9	18,8	41,3
	Controle	94	35,1	53,2	11,7	38,3
Suecos (SIGURDSSON <i>et al.</i> , 2005)	LES	480	-	-	-	24,0
	Controle	256	-	-	-	32,0
Finlandeses (HELLQUIST <i>et al.</i> , 2009)	LES	277	-	-	-	24,0
	Controle	356	-	-	-	31,0
Europeus (SUAREZ-GESTAL; CALAZA; ENDREFFY; <i>et al.</i> , 2009)	LES	1579	-	-	-	23,3
	Controle	1726	-	-	-	27,8
Turcos (CAN <i>et al.</i> , 2015)	Doença de Crohn	60	52,8	7,9	39,3	72,5
	Controle	89	56,7	18,3	25	69,2
Japoneses (SATO, K. <i>et al.</i> , 2009)	Doença de Crohn	83	62,7	30,1	7,2	23,3
	Controle	200	43,0	45,0	12,0	34,5
HapMap-CEU (dbSNP, 2018)	Saudáveis	224	-	-	-	32,1
HapMap-TSI (dbSNP, 2018)	Saudáveis	176	-	-	-	28,4
HapMap-ASW (dnSNP, 2018)	Saudáveis	96	-	-	-	13,5
HapMap-YRI (dbSNP, 2018)	Saudáveis	226	-	-	-	9,7
Africanos						
Asiáticos (dbSNP, 2018)	Saudáveis	1322	-	-	-	8,9
	Saudáveis	172	-	-	-	37,2

LEGENDA: Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (T) que são semelhantes ao Intervalo de Confiança (95%) do presente estudo. LES: Lupus eritematoso sistêmico; Ascendência européia: provenientes dos países Espanha, EUA, Alemanha, Holanda, Itália e Reino Unido. CEU: residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. TSI: Toscana na Itália. ASW: africanos do sudoeste dos Estados Unidos. YRI: africanos Yoruba em Ibadan, Nigéria (dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

FONTE: O autor (2018).

As frequências do alelo A no grupo controle (24,7%, 95% IC, 20-35) foram semelhantes às de Brasileiros (23,6%) (PELUSO *et al.*, 2013); Europeus (27,9%) (LOPEZ-ISAC *et al.*, 2016); Espanhóis (26,9%) (SUAREZ-GESTAL; CALAZA;

DIEGUEZ-GONZALEZ; *et al.*, 2009); Suecos (32%) (SIGURDSSON *et al.*, 2005), superior ao dos Africanos (8,9%) e inferior ao dos Asiáticos (37,2%) (TABELA 9).

Estes resultados conflitantes na associação entre o polimorfismo em estudo e as doenças autoimunes pode ser devido a diferenças étnicas, tamanho amostral pequeno, viés de publicação, que podem ser elucidados em estudos futuros envolvendo genotipagem mais densa em diferentes populações.

5 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos rs2476601 do gene *PTPN22* e rs2304256 do gene *TYK2* não estão associados ao DM1 na população sul-Brasileira avaliada neste estudo.
- A frequência do AMF (95%CI) no grupo controle para uma população com predominância de Euro-Brasileiros foi para o polimorfismo rs2476601 alelo T 6,3% (4-9%) e rs2304256 alelo A 24,7% (20-35%).
- As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos em estudo foram similares às aquelas descritas para outras populações caucasianas e diferentes quando comparado aos orientais.
- Os polimorfismos em estudo não apresentaram associação com os dados clínicos.
- A presença do alelo T (genótipos CT+TT) do polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22* foi associada à diminuição do índice aterogênico do plasma ($P=0,020$), calculado pelo Log(TG/HDL-c) , em indivíduos adultos portadores de DM1.

REFERÊNCIAS

- AARNISALO, J. *et al.* Reduced CD4+T cell activation in children with type 1 diabetes carrying the PTPN22/Lyp 620Trp variant. **J Autoimmun.** v. 31, n.1, p. 13-21. 2008.
- ABBASI, F. *et al.* PTPN22 Single-Nucleotide Polymorphisms in Iranian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. **Immunol Invest.** v. 46, n.4, p. 409-418. 2017.
- ABDELRAHMAN, H. M. *et al.* The association of PTPN22 (rs2476601) and IL2RA (rs11594656) polymorphisms with T1D in Egyptian children. **Hum Immunol.** v. 77, n.8, p. 682-686. 2016.
- ACHARJEE, S. *et al.* Understanding type 1 diabetes: etiology and models. **Can J Diabetes.** v. 37, n.4, p. 269-76. 2013.
- ADA. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes Care.** v. 37 Suppl 1, p. S14-80. 2014.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2018. **Diabetes Care.** v. 41, n.1, p. 172. 2018.
- ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. **Diabetes Care.** v. 42, n.Suppl 1, p. S13-S28. 2019.
- ARCANJO, C. L. *et al.* Avaliação de dislipidemia e de índices antropométricos em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 49, n.6, p. 951-958. 2005.
- ARECHIGA, A. F. *et al.* Cutting edge: the PTPN22 allelic variant associated with autoimmunity impairs B cell signaling. **J Immunol.** v. 182, n.6, p. 3343-7. 2009.
- ATHYROS, V. G. *et al.* Diabetes and lipid metabolism. **Hormones (Athens).** v. 17, n.1, p. 61-67. 2018.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet.** v. 383, n.9911, p. 69-82. 2014.
- BAMANIKAR, S.; BAMANIKAR, A.; ARORA, A. Study of Serum urea and Creatinine in Diabetic and nondiabetic patients in in a tertiary teaching hospital. **The Journal of Medical Research.** v. 2, n.1, p. 12-15. 2016.
- BARONE, B. *et al.* Family history of type 2 diabetes is increased in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice.** v. 82, p. e1 – e4. 2008.
- BEGOVIĆ, A. B. *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet.** v. 75, n.2, p. 330-7. 2004.

BLASETTI, A. *et al.* Role of the C1858T polymorphism of protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) in children and adolescents with type 1 diabetes. **Pharmacogenomics J.** v. 17, n.2, p. 186-191. 2017.

BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO, F. G. **Bogliolo: Patologia.** 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BOTTINI, N. *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet.** v. 36, n.4, p. 337-8. 2004.

BROWNLIE, R. J. *et al.* Lack of the phosphatase PTPN22 increases adhesion of murine regulatory T cells to improve their immunosuppressive function. **Sci Signal.** v. 5, n.252, p. ra87. 2012.

BULUT, T.; DEMIREL, F.; METIN, A. The prevalence of dyslipidemia and associated factors in children and adolescents with type 1 diabetes. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 30, n.2, p. 181-187. 2017.

BURN, G. L. *et al.* Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? **FEBS Lett.** v. 585, n.23, p. 3689-98. 2011.

BUTALIA, S. *et al.* Environmental Risk Factors and Type 1 Diabetes: Past, Present, and Future. **Can J Diabetes.** v. 40, n.6, p. 586-593. 2016.

CAILLAT-ZUCMAN, S. *et al.* Age-dependent HLA genetic heterogeneity of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. **J Clin Invest.** v. 90, n.6, p. 2242-50. 1992.

CAMARGO, J. L.; GROSS, J. L. Glico-hemoglobina (HbA1c): aspectos clínicos e analíticos. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 48, n.4, p. 451-463. 2004.

CAN, G. *et al.* Tyrosine kinase-2 gene polymorphisms are associated with ulcerative colitis and Crohn's disease in Turkish Population. **Clin Res Hepatol Gastroenterol.** v. 39, n.4, p. 489-98. 2015.

CENSO. **IBGE Curitiba ANO 2010.** Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/curitiba/panorama>>. Acesso em: 10 Agosto, 2018.

CHAGASTELLES, P. C. *et al.* Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. **Tissue Antigens.** v. 76, n.2, p. 144-8. 2010.

CHELALA, C. *et al.* PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. **Diabetes.** v. 56, n.2, p. 522-6. 2007.

CHILLARON, J. J. *et al.* Insulin resistance and hypertension in patients with type 1 diabetes. **J Diabetes Complications.** v. 25, n.4, p. 232-6. 2011.

CLAYTON, D. G. Prediction and interaction in complex disease genetics: experience in type 1 diabetes. **PLoS Genet.** v. 5, n.7, p. e1000540. 2009.

COHEN, S. *et al.* Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. **Blood**. v. 93, n.6, p. 2013-24. 1999.

CONWAY, B. *et al.* Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 27, n.4, p. 398-404. 2010.

COSTENBADER, K. H. *et al.* Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? **Autoimmun Rev**. v. 11, n.8, p. 604-9. 2012.

COTRAN, R. S. **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012.

COUTINHO, W. F.; SILVA JUNIOR, W. S. Diabetes Care in Brazil. **Ann Glob Health**. v. 81, n.6, p. 735-41. 2015.

DAHLQUIST, G. G. *et al.* Incidence of type 1 diabetes in Sweden among individuals aged 0-34 years, 1983-2007: an analysis of time trends. **Diabetes Care**. v. 34, n.8, p. 1754-9. 2011.

DI CIANNI, G. *et al.* Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 19, n.4, p. 259-70. 2003.

DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL/EPIDEMIOLOGY-OF-DIABETES-INTERVENTIONS-AND-COMPLICATIONS-RESEARCH-GROUP. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. **Am J Ophthalmol**. v. 129, n.5, p. 704-5. 2000.

DIABETES, C. *et al.* Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). **Arch Intern Med**. v. 169, n.14, p. 1307-16. 2009.

DIAZ-VALENCIA, P. A.; BOUGNERES, P.; VALLERON, A. J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. **BMC Public Health**. v. 15, p. 255. 2015.

DIB, S. A. Heterogeneidade do Diabetes Melito Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 52, p. 205-207. 2008.

DOBIASOVA, M. [AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice]. **Vnitr Lek**. v. 52, n.1, p. 64-71. 2006.

DOGIPARTHI, S. N. *et al.* Cutaneous manifestations of diabetic peripheral neuropathy. **Dermatoendocrinol**. v. 9, n.1, p. e1395537. 2017.

DULTZ, G. *et al.* The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. **Thyroid**. v. 19, n.2, p. 143-8. 2009.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn.** v. 8, n.1, p. 9-19. 2008.

ELEDRISI, M. S. *et al.* Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. **Am J Med Sci.** v. 331, n.5, p. 243-51. 2006.

ESPINO-PAISAN, L. *et al.* A polymorphism in PTPN2 gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes. **Immunogenetics.** v. 63, n.4, p. 255-8. 2011a.

ESPINO-PAISAN, L. *et al.* Polymorphisms in chromosome region 12q13 and their influence on age at onset of type 1 diabetes. **Diabetologia.** v. 54, n.8, p. 2033-7. 2011b.

FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose 2017. **Arq Bras Cardiol.** v. 109, n.2, p. 76. 2017.

FEDETZ, M. *et al.* The 1858T PTPN22 gene variant contributes to a genetic risk of type 1 diabetes in a Ukrainian population. **Tissue Antigens.** v. 67, n.5, p. 430-3. 2006.

FERNANDEZ-RAMOS, C. *et al.* Incidence of childhood-onset type 1 diabetes in Biscay, Spain, 1990-2013. **Pediatr Diabetes.** v. 18, n.1, p. 71-76. 2017.

FINEBERG, D.; JANDELEIT-DAHME, K. A.; COOPER, M. E. Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. **Nat Rev Endocrinol.** v. 9, n.12, p. 713-23. 2013.

FOURLANOS, S. *et al.* The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. **Diabetes Care.** v. 31, n.8, p. 1546-9. 2008.

GALVANI, G.; FOUSTERI, G. PTPN22 and islet-specific autoimmunity: What have the mouse models taught us? **World J Diabetes.** v. 8, n.7, p. 330-336. 2017.

GAZIANO, J. M. *et al.* Fasting triglycerides, high-density lipoprotein, and risk of myocardial infarction. **Circulation.** v. 96, n.8, p. 2520-5. 1997.

GIANCIECCHI, E.; PALOMBI, M.; FIERABRACCI, A. The putative role of the C1858T polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 gene in autoimmunity. **Autoimmun Rev.** v. 12, n.7, p. 717-25. 2013.

GIZA, S. *et al.* The role of PTPN22 C1858T gene polymorphism in diabetes mellitus type 1: first evaluation in Greek children and adolescents. **Biomed Res Int.** v. 2013, p. 721604. 2013.

GJORLOFF-WINGREN, A. *et al.* Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. **Eur J Immunol.** v. 29, n.12, p. 3845-54. 1999.

GOLEMBIEWSKA, E. *et al.* Renal handling of uric acid in patients with type 1 diabetes in relation to glycemic control. **Arch Med Res.** v. 36, n.1, p. 32-5. 2005.

GOMES, M. B. *et al.* Prevalence of adults with type 1 diabetes who meet the goals of care in daily clinical practice: a nationwide multicenter study in Brazil. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 97, n.1, p. 63-70. 2012.

GRAHAM, D. S. C.; AKIL, M.; VYSE, T. J. Association of polymorphisms across the tyrosine kinase gene, TYK2 in UK SLE families. **Rheumatology (Oxford).** v. 46, n.6, p. 927-30. 2007.

GROOP, L.; POCIOT, F. Genetics of diabetes--are we missing the genes or the disease? **Mol Cell Endocrinol.** v. 382, n.1, p. 726-39. 2014.

GROOP, P. H. *et al.* HDL composition predicts new-onset cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care.** v. 30, n.10, p. 2706-7. 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica. 11. ed.** Rio de Janeiro: Elsevier Ed., 2006.

HARDIE, D. G. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 4, n.5, p. 2012.

HASS, A. V.; MCDONNELL, M. E. Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Diabetes. **Endocrinol Metab Clin.** v. 47, p. 51–63. 2018.

HELLQUIST, A. *et al.* Evidence for genetic association and interaction between the TYK2 and IRF5 genes in systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol.** v. 36, n.8, p. 1631-8. 2009.

HEROLD, K. C. *et al.* Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. **Nat Rev Immunol.** v. 13, n.4, p. 243-56. 2013.

HILL, R. J. *et al.* The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. **Exp Hematol.** v. 30, n.3, p. 237-44. 2002.

HONDA, K. *et al.* Regulation of the type I IFN induction: a current view. **Int Immunol.** v. 17, n.11, p. 1367-78. 2005.

HOWSON, J. M. *et al.* Evidence of gene-gene interaction and age-at-diagnosis effects in type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 61, n.11, p. 3012-7. 2012.

HOWSON, J. M. *et al.* Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. **Diabetes.** v. 60, n.10, p. 2645-53. 2011.

HOWSON, J. M. *et al.* Evidence that HLA class I and II associations with type 1 diabetes, autoantibodies to GAD and autoantibodies to IA-2, are distinct. **Diabetes.** v. 60, n.10, p. 2635-44. 2011.

IDF. **International Diabetes Federation, 2017, 7^aed.** Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

INTERNATIONAL EXPERT, C. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**. v. 32, n.7, p. 1327-34. 2009.

IZUMI, K. *et al.* Reduced Tyk2 gene expression in beta-cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. v. 6, p. 6748. 2015.

JAHROMI, M. M.; EISENBARTH, G. S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. **Cell Mol Life Sci**. v. 64, n.7-8, p. 865-72. 2007.

JANG, W. D. *et al.* Discovery of Tyk2 inhibitors via the virtual site-directed fragment-based drug design. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 25, n.18, p. 3947-52. 2015.

JANUSZEWSKI, A. S. *et al.* Shorter telomeres in adults with Type 1 diabetes correlate with diabetes duration, but only weakly with vascular function and risk factors. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 117, p. 4-11. 2016.

JARVINEN, T. M. *et al.* Tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 polymorphisms are associated with discoid and subacute cutaneous lupus erythematosus. **Exp Dermatol**. v. 19, n.2, p. 123-31. 2010.

JEONG, I. K.; KING, G. L. New perspectives on diabetic vascular complications: the loss of endogenous protective factors induced by hyperglycemia. **Diabetes Metab J**. v. 35, n.1, p. 8-11. 2011.

KAHALY, G. J.; HANSEN, M. P. Type 1 diabetes associated autoimmunity. **Autoimmun Rev**. v. 15, n.7, p. 644-8. 2016.

KANTAROVA, D.; BUC, M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. **Physiol Res**. v. 56, n.3, p. 255-66. 2007.

KARALLIEDDE, J.; VIBERTI, G. Microalbuminuria and cardiovascular risk. **Am J Hypertens**. v. 17, n.10, p. 986-93. 2004.

KATSAROU, A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers**. v. 3, p. 17016. 2017.

KITABCHI, A. E. *et al.* Hyperglycemic Crises in Adult Patients With Diabetes. **Diabetes Care**. v. 32, n.7, p. 1335-43. 2009.

KOROLIJA, M. *et al.* Association of PTPN22 C1858T and CTLA-4 A49G polymorphisms with Type 1 Diabetes in Croats. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 86, n.3, p. e54-7. 2009.

KUHTREIBER, W. M. *et al.* Low levels of C-peptide have clinical significance for established Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 32, n.10, p. 1346-53. 2015.

KUWABARA, M. *et al.* Elevated Serum Uric Acid Level Predicts Rapid Decline in Kidney Function. **Am J Nephrol**. v. 45, n.4, p. 330-337. 2017.

KYOGOKU, C. *et al.* Genetic Association of the R620W Polymorphism of Protein Tyrosine Phosphatase PTPN22 with Human SLE. **Am J Hum Genet**. v. 75, n.3, p. 504-507. 2004.

KYOGOKU, C. *et al.* Lack of association between tyrosine kinase 2 (TYK2) gene polymorphisms and susceptibility to SLE in a Japanese population. **Mod Rheumatol**. v. 19, n.4, p. 401-6. 2009.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**. v. 19, n.19, p. 5444. 1991.

LECOMTE, P. *et al.* Self-monitoring of blood glucose in people with type 1 and type 2 diabetes living in France: the Entred study 2001. **Diabetes Metab**. v. 34, n.3, p. 219-26. 2008.

LEE, Y. H.; SONG, G. G. Meta-analysis of the family-based association between the PTPN22 C1858T polymorphism and type 1 diabetes. **Mol Biol Rep**. v. 40, n.1, p. 211-5. 2013.

LEEDS, J. S. *et al.* Complications Abnormal liver function tests in patients with Type 1 diabetes mellitus: prevalence, clinical correlations and underlying pathologies v. 26, p. 1235-1241. 2009.

LEITNER, N. R. *et al.* Tyrosine kinase 2 - Surveillant of tumours and bona fide oncogene. **Cytokine**. v. 89, p. 209-218. 2017.

LI, H. *et al.* Possible human leukocyte antigen-mediated genetic interaction between type 1 and type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, n.2, p. 574-82. 2001.

LI, P. *et al.* Lack of association of TYK2 gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**. v. 38, n.1, p. 177-8. 2011.

LIAO, P.-Y.; LEE, K. H. From SNP's to functional: the inside into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**. v. 44, p. 149-158. 2010.

LINDLEY, S. *et al.* Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 54, n.1, p. 92-9. 2005.

LINS, T. C. *et al.* Allele and haplotype frequency distribution in PTPN22 gene across variable ethnic groups: Implications for genetic association studies for autoimmune diseases. **Autoimmunity**. v. 43, n.4, p. 308-16. 2010.

LOMBARDI, A. *et al.* Interferon alpha: The key trigger of type 1 diabetes. **J Autoimmun**. v. p. 2018.

LONG, A. E. *et al.* Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis. **Diabetes**. v. 61, n.3, p. 683-6. 2012.

LOPEZ-ISAC, E. *et al.* Influence of TYK2 in systemic sclerosis susceptibility: a new locus in the IL-12 pathway. **Ann Rheum Dis**. v. 75, n.8, p. 1521-6. 2016.

MAAHS, M. D. *et al.* Dyslipidemia in Youth with Diabetes: To Treat or Not to Treat? **J Pediatr**. v. 153, n.4, p. 458-465. 2008.

MALERICH, J. P. *et al.* Diamino-1,2,4-triazole derivatives are selective inhibitors of TYK2 and JAK1 over JAK2 and JAK3. **Bioorg Med Chem Lett**. v. 20, n.24, p. 7454-7. 2010.

MARROQUI, L. *et al.* TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic beta-Cells. **Diabetes**. v. 64, n.11, p. 3808-17. 2015.

MARROQUI, L. *et al.* Interferon-alpha mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. **Diabetologia**. v. 60, n.4, p. 656-667. 2017.

MCGILL, J. B. *et al.* Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the GlycoMark assay. **Diabetes Care**. v. 27, n.8, p. 1859-65. 2004.

MELLENDEZ-RAMIREZ, L. Y.; RICHARDS, R. J.; CEFALU, W. T. Complications of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 39, n.3, p. 625-40. 2010.

MENARD, L. *et al.* The PTPN22 allele encoding an R620W variant interferes with the removal of developing autoreactive B cells in humans. **J Clin Invest**. v. 121, n.9, p. 3635-44. 2011.

MENDANHA, D. B. D. A. *et al.* Fatores de risco e incidência da retinopatia diabética. **Revista Brasileira de Oftalmologia**. v. 75, p. 443-446. 2016.

MINEGISHI, Y. *et al.* Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. **Immunity**. v. 25, n.5, p. 745-55. 2006.

MUSTONEN, N.; SILJANDER, H. Early childhood infections precede development of beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes in children with HLA-conferred disease risk. v. 19, n.2, p. 293-299. 2018.

NAGAFUCHI, S. *et al.* TYK2 Promoter Variant and Diabetes Mellitus in the Japanese. **EBioMedicine**. v. 2, n.7, p. 744-9. 2015.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. . Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>. Acesso em: 30/08/2018.

NEWTON-CHEH, C.; HIRSCHHORN, J. N. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. **Mutat Res**. v. 573, n.1-2, p. 54-69. 2005.

NIROUMAND, S. *et al.* Atherogenic Index of Plasma (AIP): A marker of cardiovascular disease. **Med J Islam Repub Iran**. v. 29, p. 240. 2015.

NORMAN, P. Selective JAK1 inhibitor and selective Tyk2 inhibitor patents. **Expert Opin Ther Pat**. v. 22, n.10, p. 1233-49. 2012.

OKRUSZKO, A. *et al.* HLA-DR, HLA-DQB1 and PTPN22 gene polymorphism: association with age at onset for autoimmune diabetes. **Arch Med Sci**. v. 8, n.5, p. 874-8. 2012.

OMIM. **ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN**. Disponível em: <<https://www.omim.org/>>. Acesso em: 30/08/2018.

ONENGUT-GUMUSCU, S.; BUCKNER, J. H.; CONCANNON, P. A haplotype-based analysis of the PTPN22 locus in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 55, n.10, p. 2883-9. 2006.

OP DE BEECK, A.; EIZIRIK, D. L. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells? **Nat Rev Endocrinol**. v. 12, n.5, p. 263-273. 2016.

OUCHI, S. *et al.* Low 1,5-anhydroglucitol levels are associated with long-term cardiac mortality in acute coronary syndrome patients with hemoglobin A1c levels less than 7.0. **Cardiovasc Diabetol**. v. 16, n.1, p. 151. 2017.

PALOMINO-MORALES, R. *et al.* Lack of association of PTPN22, STAT4 and TRAF1/C5 gene polymorphisms with cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. v. 28, n.5, p. 695-701. 2010.

PAN, A. *et al.* Relation of Smoking With Total Mortality and Cardiovascular Events Among Patients With Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis and Systematic Review. **Circulation**. v. 132, n.19, p. 1795-804. 2015.

PANDYA, D.; NAGRAJAPPA, A. K.; RAVI, K. S. Assessment and Correlation of Urea and Creatinine Levels in Saliva and Serum of Patients with Chronic Kidney Disease, Diabetes and Hypertension- A Research Study. **J Clin Diagn Res**. v. 10, n.10, p. Zc58-zc62. 2016.

PEI, Z. *et al.* A novel single nucleotide polymorphism in the protein tyrosine phosphatase N22 gene (PTPN22) is associated with Type 1 diabetes in a Chinese population. **Diabet Med**. v. 31, n.2, p. 219-26. 2014.

PELUSO, C. *et al.* TYK2 rs34536443 polymorphism is associated with a decreased susceptibility to endometriosis-related infertility. **Hum Immunol**. v. 74, n.1, p. 93-7. 2013.

PERTOVAARA, M. *et al.* Autoimmunity and atherosclerosis: functional polymorphism of PTPN22 is associated with phenotypes related to the risk of

- atherosclerosis. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Clin Exp Immunol**. v. 147, n.2, p. 265-9. 2007.
- PILEMANN-LYBERG, S. *et al*. Uric acid is not associated with diabetic nephropathy and other complications in type 1 diabetes. **Nephrol Dial Transplant**. v. p. 2018.
- PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 52, n.2, p. 156-65. 2008.
- PITHOVA, P. *et al*. Determinants of preclinical atherosclerosis are different in type 1 and type 2 diabetic women. **Physiol Res**. v. 65, n.2, p. 219-28. 2016.
- POCIOT, F.; LERNMARK, A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. **The Lancet**. v. 387, p. 2331 – 2339. 2016.
- PRADHAN, V.; BORSE, V.; GHOSH, K. PTPN22 gene polymorphisms in autoimmune diseases with special reference to systemic lupus erythematosus disease susceptibility. **J Postgrad Med**. v. 56, n.3, p. 239-42. 2010.
- PREZIOSO, G. *et al*. C1858T Polymorphism of Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor Type 22 (PTPN22): an eligible target for prevention of type 1 diabetes? **Expert Rev Clin Immunol**. v. 13, n.3, p. 189-196. 2017.
- PURNELL, J. Q. *et al*. The effect of excess weight gain with intensive diabetes mellitus treatment on cardiovascular disease risk factors and atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus: results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (DCCT/EDIC) study. **Circulation**. v. 127, n.2, p. 180-7. 2013.
- QUINN, M. *et al*. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. **Diabetologia**. v. 39, n.8, p. 940-5. 1996.
- REINEHR, T. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **World J Diabetes**. v. 4, n.6, p. 270-81. 2013.
- RIECK, M. *et al*. Genetic Variation in PTPN22 Corresponds to Altered Function of T and B Lymphocytes. **The Journal of Immunology**. v. 179, n.7, p. 4704-4710. 2007.
- RODACKI, M. *et al*. Characteristics of childhood and adult-onset type 1 diabetes in a multi-ethnic population. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 69, n.1, p. 22-8. 2005.
- RODRIGUEZ, A. *et al*. Association analysis of PTPN22, CTLA4 and IFIH1 genes with type 1 diabetes in Colombian families. **J Diabetes**. v. 7, n.3, p. 402-10. 2015.
- ROTONDI, M. *et al*. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. **Endocr Rev**. v. 28, n.5, p. 492-520. 2007.
- SABERZADEH-ARDESTANI, B. *et al*. Type 1 Diabetes Mellitus: Cellular and Molecular Pathophysiology at A Glance. **Cell J**. v. 20, n.3, p. 294-301. 2018.

SACCHETTI, C.; BOTTINI, N. Protein Tyrosine Phosphatases in Systemic Sclerosis: Potential Pathogenic Players and Therapeutic Targets. **Curr Rheumatol Rep.** v. 19, n.5, p. 28. 2017.

SACCUCCI, P. *et al.* Association between PTPN22 C1858T and type 1 diabetes: a replication in continental Italy. **Tissue Antigens.** v. 71, n.3, p. 234-7. 2008.

SAKAGUCHI, S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev.** v. 182, p. 18-32. 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory.** v. p. 1989.

SANTIAGO, J. L. *et al.* Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the PTPN22 C1858T polymorphism in the Spanish population. **BMC Med Genet.** v. 8, p. 54. 2007.

SANTIN, I.; EIZIRIK, D. L. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and beta-cell apoptosis. **Diabetes Obes Metab.** v. 15 Suppl 3, p. 71-81. 2013.

SANTOS, N. S. J. D. *et al.* Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. **Rev. Nutr.** v. 17, n.3, p. 339-349. 2004.

SATO, A. Indicators of glycemic control --hemoglobin A1c (HbA1c), glycated albumin (GA), and 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG). **Rinsho Byori.** v. 62, n.1, p. 45-52. 2014.

SATO, K. *et al.* Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. **J Clin Immunol.** v. 29, n.6, p. 815-25. 2009.

SBC. Diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de cardiologia.** v. 109, n.2, p. 15-18. 2017.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. p. 7-12. 2016.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. p. 23-24. 2017.

SCHWANDT, A.; BEST, F.; BIESTER, T. Both the frequency of HbA1c testing and the frequency of self-monitoring of blood glucose predict metabolic control: A multicentre analysis of 15 199 adult type 1 diabetes patients from Germany and Austria. v. 33, n.7, p. 2017.

SEOK, H. *et al.* 1,5-anhydroglucitol as a useful marker for assessing short-term glycemic excursions in type 1 diabetes. **Diabetes Metab J.** v. 39, n.2, p. 164-70. 2015.

SHALTOUT, A. A. *et al.* Incidence of type 1 diabetes has doubled in Kuwaiti children 0-14 years over the last 20 years. **Pediatr Diabetes.** v. 18, n.8, p. 761-766. 2017.

SHARP, R. C. *et al.* Genetic Variations of PTPN2 and PTPN22: Role in the Pathogenesis of Type 1 Diabetes and Crohn's Disease. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 5, p. 95. 2015.

SIGURDSSON, S. *et al.* Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. **Am J Hum Genet.** v. 76, n.3, p. 528-37. 2005.

SILVA, B. *et al.* Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quím. Nova.** v. 32, n.2, p. 453-462. 2009.

SILVA, M. E. R.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 52, n.2, p. 166-180. 2008.

SILVEIRA, V. *et al.* Uma Amostra de Pacientes com Diabetes Tipo 1 no Sul do Brasil **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 45, n.5, p. 8. 2001.

SKEIE, S. *et al.* Self-monitoring of blood glucose in type 1 diabetes patients with insufficient metabolic control: focused self-monitoring of blood glucose intervention can lower glycated hemoglobin A1C. **J Diabetes Sci Technol.** v. 3, n.1, p. 83-8. 2009.

SLIWINSKA-MOSSON, M.; MILNEROWICZ, H. The impact of smoking on the development of diabetes and its complications. **Diab Vasc Dis Res.** v. 14, n.4, p. 265-276. 2017.

STANFORD, S. M.; BOTTINI, N. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. **Nat Rev Rheumatol.** v. 10, n.10, p. 602-11. 2014.

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics.** v. 132, n.6, p. 1112-22. 2013.

STEFAN, M. *et al.* DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. **J Autoimmun.** v. 50, p. 33-7. 2014.

STORLING, J.; POCIOT, F. Type 1 Diabetes Candidate Genes Linked to Pancreatic Islet Cell Inflammation and Beta-Cell Apoptosis. **Genes (Basel).** v. 8, n.2, p. 2017.

STROBL, B. *et al.* Tyrosine kinase 2 (TYK2) in cytokine signalling and host immunity. **Front Biosci (Landmark Ed)**. v. 16, p. 3214-32. 2011.

SUAREZ-GESTAL, M. *et al.* Rheumatoid arthritis does not share most of the newly identified systemic lupus erythematosus genetic factors. **Arthritis Rheum**. v. 60, n.9, p. 2558-64. 2009.

SUAREZ-GESTAL, M. *et al.* Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study. **Arthritis Res Ther**. v. 11, n.3, p. R69. 2009.

SUH, Y.; VIJG, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutat Res**. v. 573, n.1-2, p. 41-53. 2005.

TAO, J. H. *et al.* Meta-analysis of TYK2 gene polymorphisms association with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases. **Mol Biol Rep**. v. 38, n.7, p. 4663-72. 2011.

TAVARES, N. A. *et al.* Association of TNF-alpha, CTLA4, and PTPN22 polymorphisms with type 1 diabetes and other autoimmune diseases in Brazil. **Genet Mol Res**. v. 14, n.4, p. 18936-44. 2015.

THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP. The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes**. v. 45, n.10, p. 1289-98. 1996.

TODD, J. A. *et al.* Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. **Nat Genet**. v. 39, n.7, p. 857-64. 2007.

TONIOLO, A.; LESLIE, R. D. Diabetes, the TYK2 Gene and the Interferon Response: In Search for Environmental Causes. **EBioMedicine**. v. 24, p. 18-19. 2017.

TONSTAD, S. Cigarette smoking, smoking cessation, and diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 85, n.1, p. 4-13. 2009.

TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do Diabetes. **Jornal Brasileiro de Medicina**. v. 102, n.5, p. 7-12. 2014.

USHER-SMITH, J. A. *et al.* The pathway to diagnosis of type 1 diabetes in children: a questionnaire study. **BMJ Open**. v. 5, n.3, p. e006470. 2015.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev**. v. 91, n.1, p. 79-118. 2011.

VAN DER WERF, N. *et al.* Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 23, n.3, p. 169-83. 2007.

VANDIEDONCK, C. *et al.* Association of the PTPN22*R620W polymorphism with autoimmune myasthenia gravis. **Ann Neurol.** v. 59, n.2, p. 404-7. 2006.

VANG, T. *et al.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. **Nat Genet.** v. 37, n.12, p. 1317-9. 2005.

VANG, T. *et al.* LYP inhibits T-cell activation when dissociated from CSK. **Nat Chem Biol.** v. 8, n.5, p. 437-46. 2012.

VANG, T. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in autoimmunity. **Annu Rev Immunol.** v. 26, p. 29-55. 2008.

VANG, T. *et al.* Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. **Autoimmunity.** v. 40, n.6, p. 453-61. 2007.

VELAGA, M. R. *et al.* The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89, n.11, p. 5862-5. 2004.

VELLA, S.; PETRIE, J. R. Macrovascular disease: pathogenesis and risk assessment. **MEDICINE.** v. 43, n.1, p. 1-6. 2015.

VIEIRA, E. A. *et al.* Razão triglicérides/HDL-C e proteína C reativa de alta sensibilidade na avaliação do risco cardiovascular. **J Bras Patol Med Lab** v. 47, n.2, p. 113-118. 2011.

VIRANI, S. S. Non-HDL cholesterol as a metric of good quality of care: opportunities and challenges. **Tex Heart Inst J.** v. 38, n.2, p. 160-2. 2011.

VOGL, C. *et al.* Transcriptome analysis reveals a major impact of JAK protein tyrosine kinase 2 (Tyk2) on the expression of interferon-responsive and metabolic genes. **BMC Genomics.** v. 11, p. 199. 2010.

VOZAROVA, B. *et al.* High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes.** v. 51, n.6, p. 1889-95. 2002.

WADWA, R. P. *et al.* Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Care.** v. 28, n.5, p. 1051-6. 2005.

WALLACE, C. *et al.* The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. **Nat Genet.** v. 42, n.1, p. 68-71. 2010.

WANG, H. *et al.* Genetically dependent ERBB3 expression modulates antigen presenting cell function and type 1 diabetes risk. **PLoS One.** v. 5, n.7, p. e11789. 2010.

WANG, X.-F. *et al.* Population-based and family-based studies on the protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 gene polymorphism and type 1 diabetes: A meta-analysis. **Gene**. v. 517, p. 191-196. 2013.

WANG, Z. *et al.* Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes. **Clin Rev Allergy Immunol**. v. 52, n.2, p. 273-286. 2017.

WELTER, M. **AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES NO DIABETES MELLITUS TIPO 1**. 163 f. - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

WELTER, M. *et al.* Polymorphism rs2476601 in the PTPN22 gene is associated with type 1 diabetes in children from the South Region of Brazil. **Gene**. v. 650, p. 15-18. 2018.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. v. p. 26-30. 2016.

WILSON, S. B. *et al.* Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. **Nature**. v. 391, n.6663, p. 177-81. 1998.

WINTER, W. E.; SCHATZ, D. A. Autoimmune markers in diabetes. **Clin Chem**. v. 57, n.2, p. 168-75. 2011.

WOJCIK, M. *et al.* Incidence of type 1 diabetes mellitus during 26 years of observation and prevalence of diabetic ketoacidosis in the later years. **Eur J Pediatr**. v. 174, n.10, p. 1319-24. 2015.

XIA, Y. *et al.* Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 35, n.1, p. e3075. 2019.

ZHU, X. W.; DENG, F. Y.; LEI, S. F. Meta-analysis of Atherogenic Index of Plasma and other lipid parameters in relation to risk of type 2 diabetes mellitus. **Prim Care Diabetes**. v. 9, n.1, p. 60-7. 2015.

ANEXO 1

Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde SCS - UFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes mellitus tipos 1, 2 e gestacional.

Pesquisador: Mauren Isfer Anghebem Oliveira

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde SCS

CAAE: 01038112.0.0000.0102

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 7186

Data da Relatoria: 28/03/2012

Apresentação do Projeto: É um estudo caso-controle para análise de determinadas proteínas (sRAGE) com retirada de sangue em sujeitos portadores de *Diabetes mellitus* tipo I (n=100), tipo 11 (n= 100) e gestacional (n=100), recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPRSEMPR, além de um grupo controle (n=300) composto de voluntários recrutados também no Hospital de Clínicas da UFPR. Para análises de dados da história clínica, biométricos dos sujeitos, os pesquisadores terão acesso ao prontuário dos sujeitos. As sRAGE encontram-se ligadas a complicações vasculares da diabetes, tendo portanto grande importância na compreensão da fisiopatologia da diabetes e de seu tratamento.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo principal da pesquisa é identificar novos biomarcadores de risco/proteção associados à presença e concentração das isoformas solúveis do receptor para produtos finais de glicação avançada (sRAGE) em portadores de *Diabetes mellitus* tipo I, " ou gestacional. Há o objetivo também de criar um biorepositório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto detalha de forma clara os riscos e os benefícios da pesquisa. Os riscos consistem nos riscos de um exame de sangue padrão (dor, incômodo, hematoma). Este exame já é feito de rotina nos pacientes portadores de Diabetes do HC, a amostra podendo ser utilizada para a pesquisa mediante o TCLE. Os benefícios são descritos claramente no projeto, assim como nos seus dois TCLE (para portadores de diabetes e controles).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa faz parte de um projeto de Doutorado em Farmácia e Bioquímica. Ela apresenta metodologia sólida, conforme descrito na análise de mérito criteriosa. Ela faz parte da formação de um biorepositório, nos TCLE está explicitado que as amostras poderão ser utilizadas em pesquisas posteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos os documentos necessários foram apresentados. Os TCLE precisam ser modificados para se adequar a legislação sobre biorepositórios.

Recomendações: O item g dos TCLE tem de ser modificado. Como se trata de uma pesquisa que cria um biorepositório e não biobanco, todas as novas pesquisas necessitarão de TCLE. O TCLE deve ser modificado para se adequar às considerações descritas acima.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Explicar que se trata da criação de um biorepositório nos objetivos. O Projeto de pesquisa pode ser aprovado, se este se adequar a legislação sobre biorepositórios, com modificações no TCLE. Citar os riscos no TCLE da armazenagem do material biológico.

No TCLE deve-se descrever caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, os sujeitos tem o direito de saber ou se recusar a saber o resultado da pesquisa.

Cada nova pesquisa necessitará de novo TCLE.

Deve-se descrever no TCLE por quanto tempo a amostra será guardada e como será descartada (ex: riscos ao meio ambiente?).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Não há considerações.

Instituição Co-Participante: Hospital de Clinicas da UFPR.

CURITIBA, 16 de Abril de 2012.

Assinado por: Claudia Seely Rocco

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Mauren Isfer Anghebem Oliveira e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente com diabetes atendido no Serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado "Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no *Diabetes mellitus* tipos 1, 2 e gestacional", que vai pesquisar a presença de formas solúveis desse receptor no seu sangue. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes e ainda conhecer os fatores que levam o paciente diabético a ter maior ou menor risco para complicações vasculares, como o pé diabético, a cegueira e o infarto do coração.
- b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- c) O sangue será coletado durante o procedimento de coleta de rotina do serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR), após sua consulta médica, sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o *Diabetes mellitus* tipos 1, 2 e gestacional, 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o diabetes, 3) novas associações entre a presença das formas do receptor que pretendemos estudar e as complicações do diabetes. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o diabetes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável _____

Orientador _____ Orientado _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

- i) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Mauren Isfer Anghebem Oliveira (mauren.isfer@ufpr.br) e Geraldo Picheth (gpicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento no serviço de Endocrinologia Diabética, que está assegurado.
- l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no próprio serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- o) Caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, você terá o direito de saber ou se recusar a saber o resultado.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item “e”. Em relação ao item “o”, eu _____ (desejo/ não desejo) saber os resultados/descobertas feitas referentes à pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

<p align="center">Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>
--

ANEXO 3

Questionário utilizado para coleta de dados dos pacientes com DM1.

Planilha de coleta de dados:

Caracterização do Paciente		Data
Registro HC:		/ /
Nome:		
Dados clínicos		
N	Dados	Obs.
1	Idade	[.] anos
2	Peso	[] kg
3	Altura	[] cm
4	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
5	Tipo de Diabetes	(1)= Tipo 1 (2)= Tipo 2 Tempo do início do DM; anos
6	Pressão Arterial (PA)	[]/[] mmHg Medicamentos para pressão:
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
8	Histórico Obesidade	(1)= Sim (2)= Não pessoal
9	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não Quais:
10	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de Doença Tireoideana	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
12	Medicamentos:	<u>Descrever:</u> <u>Hipolipemiante</u> <u>Tireóide</u> <u>Hipoglicemiante:</u> <u>Insulina:</u>
13	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: Creatinina Microalbuminúria: TSH: aTG aTPO Outros:
14	Outras patologias:	Doenças Autoimunes: (1)= Sim (2)= Não
15	Outras observações	

ANEXO 4

Exemplo de PCR em tempo real para o SNP rs2476601 do gene *PTPN22*.

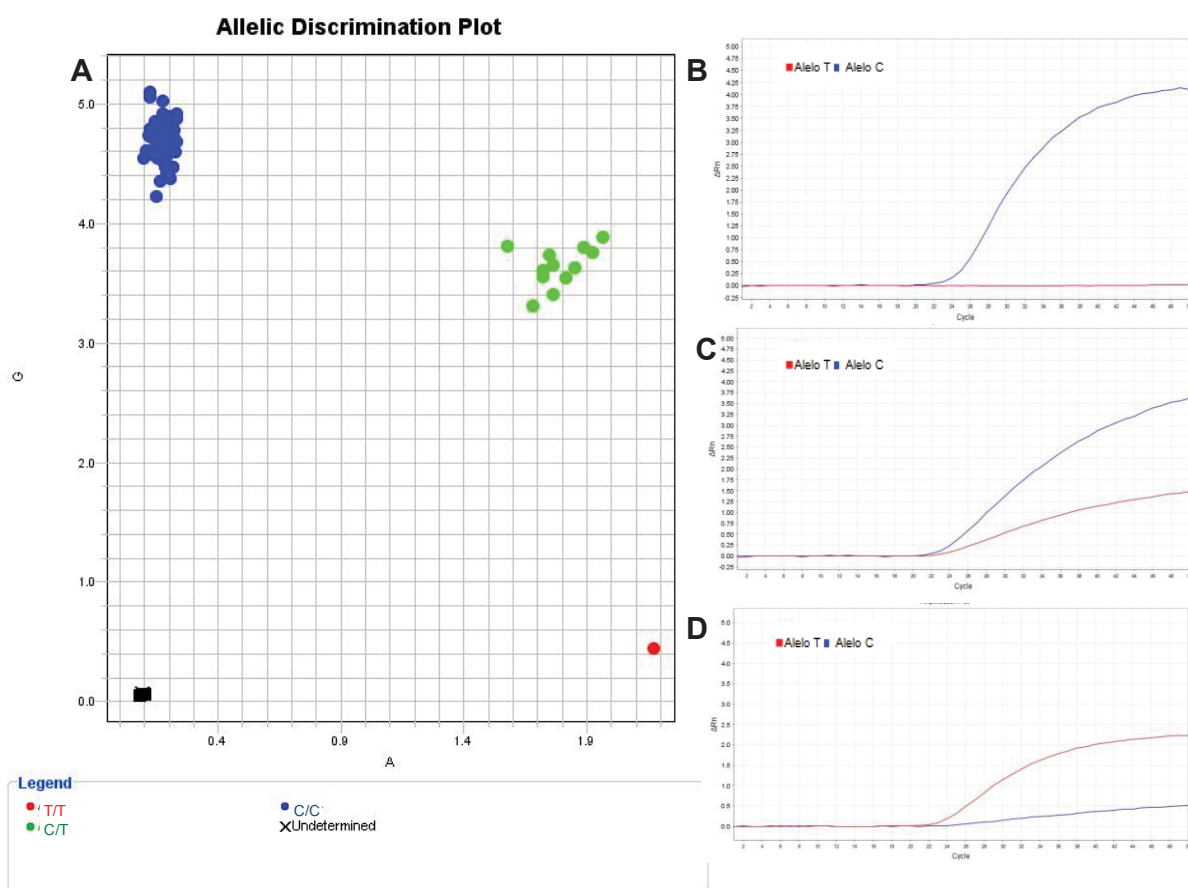


Gráfico de discriminação alélica SNP rs2476601 A) Discriminação alélica. Em azul estão as amostras homozigotas (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CT), e em vermelho amostras homozigotas (genótipo TT), em preto controle negativo. B) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo CC. C) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo CT. D) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo TT.

ANEXO 5

Exemplo de PCR em tempo real para o SNP rs2304256 do gene *TYK2*.

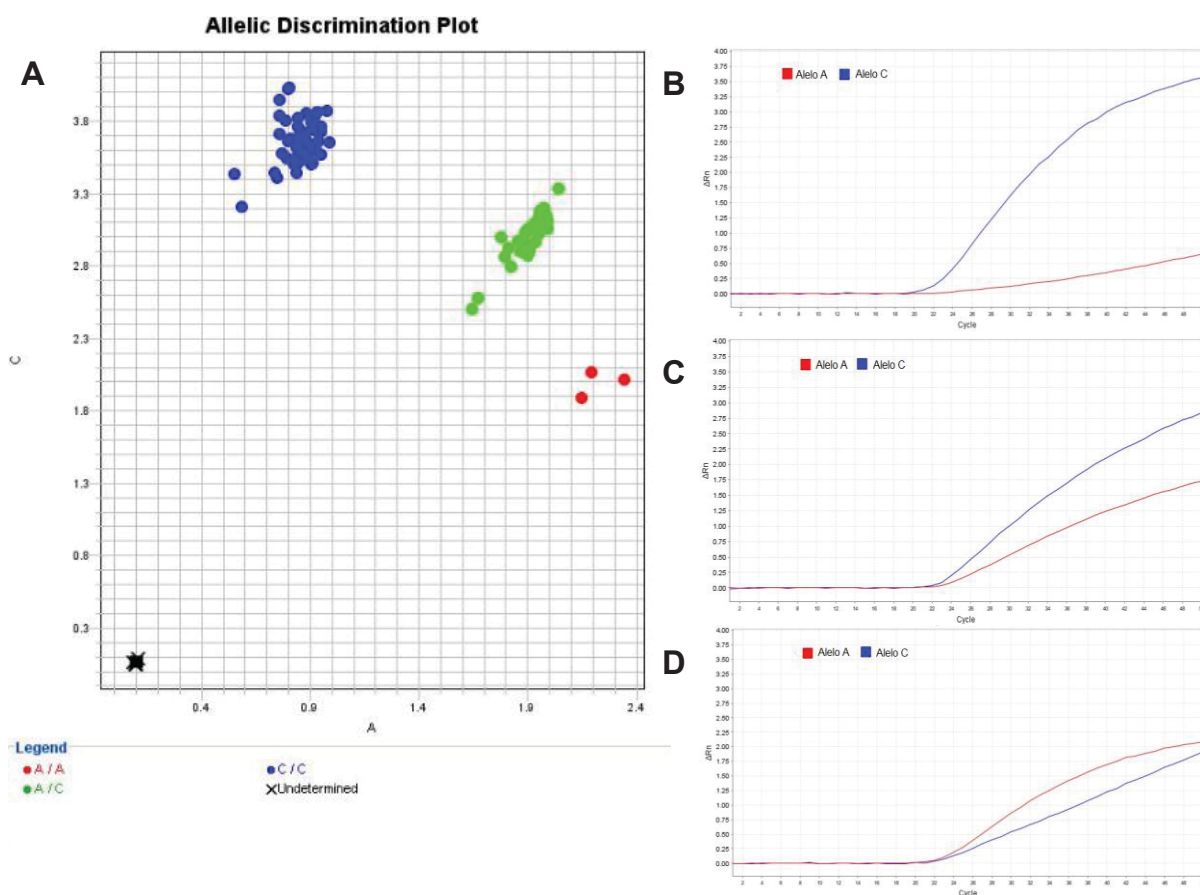


Gráfico de discriminação alélica SNP rs2304256 A) Em azul estão as amostras homozigotas (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CA), e em vermelho as amostras homozigotas (genótipo AA), em preto controle negativo. B) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo CC. C) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo CA. D) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo AA.